Archiv für Hygiene und Bakteriologie

ARCHIV FÜR HYGIENE.

(BEGRÜNDET VON **MAX v. PETTENKOFER.**)

UNTER MITWIRKUNG

VON

Prof. Dr. O. BOLLINGER, München; Prof. Dr. BONHOFF, Marburg a. L.; Prof. Dr. R. EMMERICH, München; Prof. Dr. F. ERISMANN, Zürich; Prof. Dr. HEIM, Erlangen; Prof. Dr. F. HUEPPE, Prag; Prof. Dr. KABRHEL, Prag; Prof. Dr. F. KRATSCHMER, Wien; Prof. Dr. K. LEHMANN, Würzburg; Prof. Dr. A. LODE, Innsbruck; Prof. Dr. L. PFEIFFER, Rostock; Prof. Dr. W. PRAUSNITZ, Graz; Prof. Dr. F. RENK, Dresden; Prof. Dr. SCHOTTELIUS, Freiburg i. B.; Generaloberarzt Dr. A. SCHUSTER, München; Prof. Dr. WERNICKE, Posen

HERAUSGEGEBEN

VON

J. FORSTER, M. GRUBER, FR. HOFMANN, M. RUBNER,

O.Ö. PROFESSOREN DER HYGIENE UND DIREKTOREN DER HYGIENISCHEN INSTITUTE AN DEN UNIVERSITÄTEN ZU

STRASSBURG MÜNCHEN LEIPZIG BERLIN.

VIERUNDFÜNFZIGSTER BAND.

Mit 4 Abbildungen und 2 Tafeln.

MÜNCHEN UND BERLIN.

DRUCK UND VERLAG VON R. OLDENBOURG.

1905.

Inhalt.

Spezifische Sera gegen Infusorien.

Von

Privatdozent Dr. **Robert Rößle**
in Kiel.

(Aus dem Hygienischen Institute der Universität München.)

Die vorliegende Arbeit ging von dem Gedanken aus, zu versuchen, ob sich unsere Kenntnis von der Morphologie der spezifischen Toxin-Wirkung dadurch fördern liefse, dafs man statt der bisher gewöhnlich gebrauchten Antigene grofse einzellige Lebewesen aus der Klasse der Protozoen als Immunisierungsmaterial .verwendete. Es lag dabei zunächst die Absicht zugrunde, an neuen Versuchsobjekten zu prüfen, ob die kürzlich von mir ([15]) beschriebenen morphologischen Veränderungen von Erythrozyten durch das inaktivierte spezifisch lytische Serum der Ausdruck einer allgemeinen Gesetzmäfsigkeit sind. Erwies sich die Annahme, dafs sich auch mit Protozoen Antikörper lytischer und agglutinierender Natur gewinnen liefsen, was nach dem bisher über die Immunitätsreaktionen des Warmblüter-Organismus Bekannten doch grofse Wahrscheinlichkeit hatte, als richtig, so sollte die Wirkungsweise der betreffenden Stoffe auf die Protozoen dann auch im aktiven Zustande studiert werden. In zweifacher Hinsicht, gerade vom morphologischen Standpunkte aus, versprach die Immunisierung mit Protozoen einen Erfolg und bestimmte Vorteile gegenüber der Verwendung der sonst gebräuchlichen Antigene: bei den Bakterien hindert die Kleinheit

der Zelle und die mangelnde Differenzierung in Kernapparat und Zelleib die Beobachtung der durch spezifisch lytische Stoffe erzeugten feineren morphologischen Veränderungen und die Verwertung der Befunde für die Erklärung der einschlägigen Störungen im höheren Organismus; bei den roten Blutkörperchen anderseits erwies sich, ein so günstiges Versuchsobjekt sie in anderer Hinsicht sein mögen, ihre fragliche Zellnatur, ihr ganz eigentümlicher Bau und die Unmöglichkeit zu entscheiden, ob man im gegebenen Falle überhaupt lebende oder tote Objekte vor sich hat, als mifslich. Gegen die Brauchbarkeit der weifsen Blutzellen zum Zweck des Studiums der morphologischen Seite der Toxinwirkung sprach von vornherein die Unmöglichkeit, die Leukozyten unter vollkommen natürlichen Existenzbedingungen zu beobachten, sowie die verhältnismäfsig kurze Dauer ihres Überlebens aufserhalb des Organismus. Alle diese Nachteile haften den freilebigen Protozoen nicht an: ihre Gröfse versprach zunächst eine bequemere Beobachtung der, wie ich nach Analogie der bisherigen Erfahrungen annahm, eintretenden Auflösungserscheinungen, ihr den höheren Zellen wenigstens ähnlicher Bau liefs hoffen, dafs man vergleichende Schlüsse zur menschlichen Pathologie wagen durfte und schliefslich bestand bei ihnen auch die Möglichkeit, die Zellen unter natürlichen Lebensverhältnissen der Toxinwirkung aussetzen und jederzeit entscheiden zu können, ob man lebende oder tote Objekte vor sich habe. Zur Verwendung kamen Infusorien und Flagellaten. Es soll gleich hier vorweggenommen werden, dafs die Annahme, es könnten sich durch Immunisierung mittels dieser Antikörper lytischer Natur gewinnen lassen, als irrtümlich herausgestellt hat. Wenn nun auch die Untersuchung in morphologischer Richtung bisher kein Resultat gehabt hat, so sind die dabei gemachten Beobachtungen doch in anderen Hinsichten mitteilenswert.

Der Immunisierung mit Protozoen stellten sich zunächst dadurch Schwierigkeiten entgegen, dafs es jeweils einer mühseligen Vorarbeit bedurfte, um genügend viel und genügend reines Material zur Behandlung zu erhalten. Was die Menge betrifft, so konnte man hoffen, durch Aufstellung sehr zahlreicher

Zuchtgläser genügende Quantitäten zu bekommen. Als Versuchsobjekt wurde das gewöhnlich für physiologische Zwecke verwendete und deshalb in vielen Eigenschaften schon wohlbekannte Paramäcium caudatum gewählt, das allerdings in den Wintermonaten nicht recht zum Gedeihen zu bringen ist, weshalb die Immunisierung oft in unregelmäßsigen Zeitintervallen vorgenommen werden mußste. Eine Reinkultur von Paramäcien und Protozoen überhaupt im bakteriologischen Sinne war ja schon von vornherein ausgeschlossen, da sie sich ja nicht auf osmotischem Wege ernähren, sondern auf körperliche Nahrungsaufnahme angewiesen sind. Paramäcium frißst, ohne in bezug auf die Arten wählerisch zu sein, Bakterien. Es ließs sich also jedenfalls die gleichzeitige Einbringung von Bakterien mit den Paramäcien bei den Injektionen zur Immunisierung nicht umgehen.

Allein alle Versuche, Paramäcien zu isolieren und in isoliertem Zustande mit bestimmten, aus den Aufgüssen gezüchteten Bakterien zu kultivieren, mißslangen. (Diese Versuche wurden gemacht, um Sicherheit dagegen zu gewinnen, daßs wenigstens nicht pathogene Mikroorganismen miteingespritzt wurden.) Dagegen gelang dies ohne viel Schwierigkeiten bei einem anderen Infusor, dem Glaukoma scintillans Ehrenbergi. Dieses Infusor verträgt offenbar höhere Grade der Fäulnis als andere Protozoen, so daßs, wenn man in einem Aufgußs, in dem es von allen möglichen Vertretern aus dem Protistenreich wimmelt, durch Zusatz von Bouillon die Vermehrung der Fäulnisbakterien steigert, das Glaukoma alle anderen Protozoen überwuchert, bis man es zuletzt sogar ausschließslich darin findet. Aus solchen Infusionen wurde dann das Ausgangsmaterial für die Reinzuchten[1])

1) Da der Ausdruck ›Kultur‹ gewöhnlich im Sinne von ›Reinkultur‹ gebraucht wird und also nur für Bakterien verwendet werden kann, so wird im folgenden das deutsche Wort ›Zucht‹ für die künstlich gehaltenen Protozoen-Stämme gebraucht und das Wort ›Reinzucht‹ könnte dann für diejenigen Protozoen-Zuchten reserviert sein, in denen die betreffende Infusorien- oder Flagellaten- (oder Amöben-) Art allein vorhanden ist, gleichgültig, ob sie sich dabei von einer oder von vielen Bakterienspezies dabei ernährt. Der Ausdruck ›Reinzucht von Protozoen‹ ist für denjenigen nicht mißsverständlich, der sich bewußst ist, daßs es eine solche Reinzucht ohne Bakterien (resp. anderes körperliches Material) nicht geben kann.

des Glaukoma gewonnen, indem es mit Wasser im Sinn einer Nägelischen »Einzelkultur« so verdünnt wurde, dafs man mit einer sterilisierten Pipette ein einzelnes Tier herausfangen und in einen sterilen Erlenmayerschen Kolben einbringen konnte. Der Kolben war bis zu einer bestimmten Marke mit stark verdünnter steriler Bouillon gefüllt (je 1 ccm Bouillon auf 50 ccm Leitungswasser). Es überwog sehr bald eine Bakterienart, welche in der Vermehrung dann mit dem Glaukoma, welches so reichliche Nahrung fand, geradezu wetteiferte. Wurde eine solche Zucht nun wieder stark verdünnt und mit einem Glaukoma daraus ein neuer Erlenmayer-Kolben beschickt, so erhielt man eine Reinzucht von Glaukoma mit einem einheitlichen Futter, einer einzigen Bakterienart. Diejenige, welche ich in meinen Glaukomazuchten hatte, war ein kurzes, plumpes Stäbchen, welches Gelatine verflüssigte. Ich habe es nicht weiter bestimmt, weil Glaukoma sich ebenso sicher mit vielen anderen Bakterienarten zusammen züchten läfst und deshalb eine Indentifizierung jenes Bakteriums keinen Wert hatte. Die Zuchten wurden auf folgende Weise weitergeführt. Der Höhepunkt der Glaukomavermehrung tritt etwa am 4. und 5. Tag nach der Impfung eines auf die angegebene Weise beschickten Erlenmayer-Kolbens ein. Ungefähr um diese Zeit tritt aber, offenbar durch die enorme Gefräfsigkeit der Infusorien, mehr und mehr Bakterienarmut und dadurch auch bald Nahrungsmangel für Glaukoma ein. Sie gehen vom 6. oder 7. Tag ab an Zahl offenbar zurück, vielleicht gelangen in die Flüssigkeiten auch schädliche Stoffwechselprodukte; kurz, wenn man die Zucht am Leben erhalten will, so mufs man frische verdünnte Bouillon zusetzen, am besten indem man einfach die alte Zucht bis auf Reste abgiefst und den Kolben mit verdünnter Bouillon bis zur Marke wieder auffüllt. Es findet dann sofort eine starke Vermehrung der Futterbakterien und des Glaukoma statt, auch wenn die Kultur schon nahe dem Aussterben war (welches allerdings erst nach Wochen stattfindet). Zu Zwecken der Immunisierung erwies es sich am vorteilhaftesten, wenn zu dem Zeitpunkte, zu welchem die stärkste Bevölkerung der Flüssigkeit mit Glaukoma gefunden wurde

etwa am 5. Tage), die Zucht bis auf Reste abgegossen wurde, der Abgufs zentrifugiert und das Zentrifugat, welches die ausgeschleuderten Infusorien und verhältnismäfsig wenig Bakterien enthielt, injiziert wurde, während mit den im Kolben zurückgebliebenen Resten die Zucht durch Auffüllung neuer Nährflüssigkeit für die Bakterien wieder zum Aufblühen gebracht wurde. Glaukoma liefs sich auch in Petrischalen bequem züchten. Es ist zweckmäfsig, so zu verfahren, dafs man ½ Agarröhrchen in der Schale schief erstarren läfst, und den übrigen Raum mit Leitungswasser so ausfüllt, dafs der Wasserspiegel eben noch den Rand der Agarschichte erreicht; dies hat den Vorteil, dafs einerseits die des Sauerstoffs bedürftigen Bakterien noch auf dem Agar wachsen können, anderseits aber den frei im Wasser schwimmenden Infusorien zugänglich sind. Die zunehmende Verdunstung des Wassers legt immer nur einen kleinen Teil der Agarfläche trocken. In dieser Weise hielten sich bei Zimmertemperatur Glaukoma-Reinzuchten monatelang ohne Erneuerung. Erreicht die Verdunstung des Wassers solche Grade, dafs die Infusorien nicht mehr frei schwimmen können, so passen sie sich in merkwürdiger Weise den veränderten Lebens- und Bewegungsbedingungen an, indem ihr Protoplasma flüssiger zu werden scheint und sie dadurch befähigt, in einer an die Fortbewegung der Amöben erinnernden Art den Ort zu verändern.

Bei der Anlegung von Protozoen-Reinzuchten kommt es darauf an, Eigenschaften ausfindig zu machen, welche nur der betreffenden Art, die man züchten will, zukommen. Gelang die Reinzucht von Glaukoma dadurch, dafs es intensivere Grade der Fäulnis (und auch höhere molekulare Konzentration der Nährmedien) aushält als andere Protozoen, so fand ich später zufällig, dafs die Paramäcien in anderer Hinsicht widerstandsfähiger sind als die übrigen Tiere, welche man in Infusionen zu finden pflegt: während nämlich z. B. Glaukoma, Stentor, Colpidium, Stylonychia u. a. bei Erwärmung der Infusion auf 37° zugrunde gehen, überleben die Paramäcien allein diese Prozedur. Es ist infolgedessen höchst einfach, grofse Mengen Paramäcien

in Reinzucht, allerdings mit den verschiedenartigsten Bakterien zusammen, zu erhalten[1]), und es gestaltete sich die Gewinnung des Materials zur Immunisierung gegen Paramäcien auf folgende Weise:

Ein sterilisiertes, hohes Becherglas wurde, mit Leitungswasser gefüllt und mit einer sauberen Glasschale bedeckt, mehrere Tage stehen gelassen (frisches Leitungswasser schädigt die Paramäcien), und dann mit Salatblättern, welche in heifses Wasser auf kurze Zeit getaucht waren, versehen. Impft man nun möglichst sorgfältig isolierte Paramäcien ein, so erhält man zu günstiger Jahreszeit in wenigen Tagen eine üppige Zucht. Es ist zunächst nicht immer zu vermeiden, dafs sich auch andere Protisten entwickeln, aber man kann sie in den Gläsern leicht los werden, indem man diese auf 24 Stunden in den Brutschrank von 37° bringt. Dies hat gleichzeitig den Vorteil, dafs durch die erhöhte Temperatur den Paramäcien sehr rasch folgende Teilungen sozusagen aufgezwungen werden, so dafs man in dem Brutschrank gleichzeitig ein Mittel hat, um sie von anderen Protozoen zu isolieren und sie allein zu enormer Vermehrung zu bringen. Die Teilungen wiederholen sich infolge des Einflusses der Wärme so schnell, dafs die Tiere nach der Teilung nicht mehr die alte Gröfse erreichen, und man erhält durch fortgesetzte Züchtung im Brutofen Zuchten von wesentlich kleineren Tieren als die Tiere der Ausgangszuchten waren. Diese Tatsache ist aber für die Zwecke der Immunisierung, bei der es sich zunächst nur um die Gewinnung möglichst grofsen und möglichst einheitlichen Materiales zur Vorbehandlung handelt, gleichgültig. Wenn das faulende Salatwasser sehr dicht von Paramäcien erfüllt schien, so wurde der gröfsere Teil der Zucht zur Zentrifugierung abgegossen und das Glas mit abgestandenem, steril aufbewahrtem Leitungswasser wieder aufgefüllt. Trat Nahrungsmangel ein, was an der zu-

1) Es gibt allerdings eine winzige Flagellaten-Art, Chilodon-Paramäcium, welche sehr gerne mit Paramäcium caudatum vorzukommen pflegt, und welche ihm auch darin gleicht, dafs sie die Erwärmung auf 37° manchmal unter Umständen, die mir nicht näher bekannt sind (Gewöhnung?), übersteht.

nehmenden Magerkeit der Paramäcien leicht erkannt werden kann, so wurden wieder Salatblätter zugegeben usf. Auf diese Weise liefs sich eine üppige Zucht monatelang in denselben Gläsern unterhalten. Gerade der Wechsel von Hunger und starker Ernährung liefert die gröfste Vermehrung und scheint die Zuchten vor den Depressionszuständen zu bewahren, welche zuerst von Calkins und von R. Hertwig beobachtet wurden. Die »Depression« besteht in der Unfähigkeit zu Assimilation und Vermehrung und tritt am schnellsten in gleich- und übermäfsig gefütterten Zuchten auf.

Das Impfungsmaterial wurde aus den Abgüssen der Zuchtgläser durch Zentrifugieren gewonnen. Diese Arbeit ist um so mühseliger, als es sich nicht empfiehlt, sie sich dadurch zu erleichtern, dafs man die Paramäcien zuvor abtötet und dadurch ihre Eigenbewegung, welche von schwachen Zentrifugen nicht wirksam genug unterdrückt wird, aufhebt. Es erschien vielmehr notwendig, die unveränderte Substanz der Paramäcien zur Injektion zu gebrauchen. Mittels einer kräftigen Zentrifuge kann man bei einiger Übung in einer halben Stunde ungefähr aus einem Liter Zuchtflüssigkeit die Paramäcien erhalten, indem man je zwei je 10 ccm fassende Röhrchen füllt, zehn Sekunden kräftig schleudert, ziemlich rasch anhält und sofort abgiefst, mit neuer Zuchtflüssigkeit anfüllt usf. Die zehn Sekunden genügen, die schweren Paramäcien auszuschleudern, und je kürzer man zentrifugiert, desto weniger Bakterien wird der Bodensatz enthalten.

Zunächst wurden drei Tiere immunisiert: erstens zwei Kaninchen, welche subkutan Paramäcien erhielten, und ein Meerschweinchen, welches ebenfalls subkutan die Zentrifugate der Reinzuchten des Glaukoma scintillans injiziert bekam. Dem Umstande, dafs mit letzterem nur eine und zwar offenbar unschädliche Bakterienart einverleibt wurde, ist es wohl zuzuschreiben, dafs das Meerschweinchen die Behandlung sehr gut vertrug und nur einmal eine harte Infiltration an einer Injektionsstelle aufwies. Dagegen traten bei dem einen Paramäcienkaninchen mehrmals Abszesse auf, da ja mit den Paramäcien unkontrolliert viele und verschiedene Mikroorganismen

unter die Haut gebracht wurden. Von Protozoen wurden aufser den Paramäcien zuweilen recht zahlreiche Vertreter jener schon erwähnten winzigen Flagellatenart, des Chilodon paramäcium mit eingespritzt, weil sie sich zuweilen auch durch erhöhte Temperatur nicht aus der Gesellschaft der Paramäcien vertreiben lassen. Übrigens war dieser Umstand keineswegs mifslich, im Gegenteil, es wurde auf diese Weise von demselben Tiere ein zweiter Antikörper gleichzeitig gewonnen, wie aus der folgenden Schilderung hervorgehen wird. Später wurde zur Kontrolle die Immunisierung eines weiteren Kaninchens gegen Paramäcinen ausgeführt, wobei sich die jüngst von Löffler(8) angegebene Methode der Antikörpergewinnung sehr bewährt hat. Es standen also im ganzen vier Antiprotozoensera zur Verfügung, über deren Eigenschaften und Wirkungsweise hier berichtet werden soll.

Serum I.

Ein junges Kaninchen erhält innerhalb eines Zeitraums von mehreren Monaten im ganzen 4 subkutane Injektionen je 10 ccm sehr dichter Aufschwemmung von Paramäcien und wird 10 Tage nach der letzten Einspritzung entblutet. Es vertrug die Injektionen ohne Störung.

Serum II.

Ein junges, im Wachstum begriffenes Kaninchen (2750 g) erhält innerhalb von $2^1/_2$ Monaten im ganzen 6 subkutane Injektionen von Paramäcien (mit Chilodon paramäcium). Das Serum war schon nach der dritten Injektion wirksam. Das Tier litt während der Behandlung an häufiger Abszefsbildung, ohne aber an Gewicht abzunehmen. Die Abszesse wurden eröffnet, entleert und heilten gut. Die Blutproben wurden den Ohrvenen entnommen.

Serum I und II werden, weil in ihren Eigenschaften gleich, zusammen besprochen.

Da die Paramäcien in fauligem Wasser freilebende Tiere und gegenüber höheren Salzkonzentrationen so empfindlich sind, dafs sie in Konzentrationen, welche dem Serum entsprechen, und natürlich auch in diesem selbst in ganz kurzer Zeit unter Zerfliessungserscheinungen und rascher Gerinnung ihres Protoplasmas und Kerns absterben, so mufste vor allem zunächst diejenige schwächste Verdünnung von normalem Kaninchenserum festgestellt werden, welche für die Paramäcien harmlos ist und mit

dieser indifferenten Verdünnung des Normalserums mufste eine gleich schwache Verdünnung des spezifischen Serums verglichen werden. Verhielten sich in dieser die Paramäcien anders als in der gleichen Verdünnung des Normalserums und als die Kontrolltiere aus der Zucht, so konnte das abweichende Verhalten auf besondere Stoffe des spezifischen Serums bezogen werden. Um nicht Irrtümern durch zufällige Verunreinigungen ausgesetzt zu sein, wurden nur sterile Reagenzgläser und Pipetten und sehr sorgfältig gereinigte und getrocknete Uhrschälchen verwendet; die Mischungen von Serum und Paramäcien wurden in Reagenzgläsern angesetzt und gewöhnlich sofort nach Mischung die Hälfte in eine Uhrschale zur Untersuchung mit schwachen Vergröfserungen ausgegossen; zur genaueren Beobachtung wurden einzelne Tiere herausgefangen und unter dem mit Wachsfüfschen gestützten Deckglas, seltener im Hohlobjektträger beobachtet. Die Verdünnungen des Serums wurden durch unmittelbare Vermischung desselben mit der die Paramäcien enthaltenden Zuchtflüssigkeit hergestellt; in besonderen Fällen war es aber erforderlich, die Paramäcien in einem anderen, für sie vollkommen indifferenten Medium der Toxinwirkung auszusetzen; als dieses erwies sich abgestandenes Leitungswasser von Zimmertemperatur.

Der Grundversuch bestand also, wie gesagt, darin, das aktive Serum eines normalen mit dem aktiven Serum des mit Paramäcien vorbehandelten Kaninchens zu vergleichen und diejenige Verdünnung festzustellen, bei welcher einerseits durch das erstere keinerlei Störung mehr auftrat, anderseits zu sehen, ob dieselbe Verdünnung des spezifischen Serums noch eine Wirkung ausübte. Dies war der Fall bei 20facher Verdünnung beider Sera; hier trat die spezifische Wirkung deutlich und ausschliefslich zutage. In höheren Konzentrationen war allerdings auch ein durchgreifender Unterschied vorhanden, allein die spezifische Schädigung war kombiniert und dadurch verwischt mit der osmotischen, und deshalb wurde in den meisten der folgenden Versuche zum Studium der reinen, spezifischen Wirkung die 20- und die 40-fache Verdünnung des spezifischen Serums gebraucht. Die 40-fache deshalb, weil es sich herausstellte, dafs das ganz frische aktive Nor-

malserum hie und da noch die Beweglichkeit der Paramäcien in 20-facher Verdünnung stört; die Schädigung wird aber im Gegensatze zu der spezifischen sehr schnell überwunden.

Es besteht nämlich die spezifische toxische Wirkung in einer intensiven, langdauernden Lähmung der Paramäcien, und zwar beteiligen sich an der Lähmung zunächst nur die Wimpern der Oberfläche, bei höherem Grade auch die kontraktilen Vakuolen und schliefslich auch die undulierende Membran des Cytostoms, also die Organe der Fortbewegung, der Exkretion (Atmung?) und der Nahrungsaufnahme. Beschränkt sich die Lähmung auf die Cilien der Oberfläche, so erholen sich die Paramäcien nach 3—5 Tagen. Sie vermögen unter diesen Umständen im Zustande der völligen Fortbewegungs-Unfähigkeit Nahrung aufzunehmen und zu verdauen, ja sie sind sogar imstande Teilungen auszuführen und begonnene Teilungen zu vollenden.

Im einzelnen gestaltet sich der Vorgang der spezifischen Wirkung folgendermafsen: Bringt man Paramäcien in eine 20-fache Verdünnung von Antiparamäcienserum, so tritt zunächst ein bald nur Bruchteile einer Minute, bald mehrere Minuten währendes Stadium der Erregung ein, welche sich in lebhaft hin- und herschiefsenden Vorwärtsbewegungen äufsert. Diese werden aber bald nach einem Augenblick des Stillstandes durch kurze, sehr heftige, ruckweise Vorstöfse unterbrochen, denen zuerst schnell vorübergehende, dann immer länger dauernde rückwärts gerichtete Wirbelbewegungen folgen. Die normale Locomotion der Paramäcien beschreibt eine Schraube mit sehr lang gezogenen Windungen nach vorwärts, die pathologische Drehbewegung nach rückwärts besteht in der Ausführung einer Schraube mit mehr und mehr verschwindender Höhe der Schraubengänge, bis schliefslich eine Drehung am Platze eintritt, welche immer mehr sich verlangsamt. Man kann in diesem und in dem Stadium anscheinend vollkommener Lähmung, in die die Drehung ausläuft, durch kalorische und mechanische Reize die Paramäcien zu kurzen, sofort nachlassenden Vorwärtsbewegungen oder auch zu

Wirbeln veranlassen, wenn nicht unterdessen eine weitere Erscheinung eingetreten ist, die auch selbständig vor Eintritt der Lähmung Platz greifen kann; es ist eine Erscheinung, welche an die Agglutination der Bakterien erinnert und ihr vielleicht analog ist: die Verklebung der Paramäcien mit der Oberfläche anderer fester Körper in ihrer Umgebung, vielleicht durch ein Klebrigwerden ihrer Cilien. Merkwürdigerweise bleiben sie nun nie aneinander hängen, sondern haften immer nur am Glase, an Bakterienhaufen oder an Exemplaren jener kleinen Flagellatenart, die, bei der Immunisation mitverwendet, ebenfalls gelähmt wurde. Wurden andere, zur Immunisierung nicht verwendete Protozoen der Wirkung des Antiparamäcien-Serums gleichzeitig ausgesetzt, so wurden diese niemals in ihrer Bewegungsweise gestört, nicht gelähmt, und die Paramäcien blieben nicht an ihnen hängen. Dieser Versuch beweist also gleichzeitig die Spezifität des gewonnenen Serums. Ja, diese Spezifität des Serums ging soweit, dafs keine andere Paramäcienart, sondern nur Paramäcium candatum gelähmt wurde. Ob übrigens ein bestimmtes Paramäcium infolge von Lähmung oder von Agglutination still lag, war leicht zu entscheiden, denn die festgeklebten Paramäcien machen meist, jedenfalls immer auf Reize (Erschütterung) hin, gewaltige und manchmal erfolgreiche Anstrengungen, wieder loszukommen; bleiben sie haften, so sieht man deutlich, an welchen Punkten sie festkleben und in welchen Richtungen ihre Bewegungsmöglichkeit beschränkt ist; gelähmte Paramäcien lassen sich durch Bewegung der Uhrschale nach Willkür hin- und herschwenken; gelähmte und gleichzeitig angeklebte Tiere pendeln dabei um ihren Fixationspunkt. Es ist bekannt, dafs gesunde Paramäcien aufser zur Zeit der Konjugationsepidemien die gegenseitige Berührung vermeiden, jedenfalls wenn sie sich berühren, schnell entfliehen. Dies ist den vom spezifischen Serum beeinflufsten Tieren nicht möglich; geraten sie aneinander, so haben sie oft Schwierigkeiten, auseinanderzukommen; trotzdem sieht man niemals Paramäcien dauernd oder zu mehreren verklebt, auch dann nicht, wenn man Paramäcien allein in Wasser der Serumwirkung aussetzt. Selbst gelähmte Tiere sah ich niemals aneinander fest-

geheftet. Es ist deshalb vielleicht nicht richtig, den Ausdruck Agglutination für jene Zustände zu gebrauchen, da man darunter das Zusammenkleben gleichartiger Zellen untereinander durch spezifisches Serum zu verstehen gewohnt ist. Vorgänge, welche der Bakteriolyse analog zu setzen gewesen wären, traten nicht ein, auch nicht bei tagelanger Beobachtung, weder bei Zimmer- noch bei Brütofentemperatur von 37°. Selbst im schwach und gar nicht verdünnten Serum kamen keine eindeutigen Befunde zustande. Es wurde die Wirkung von 5- und 10fachen Verdünnungen von aktivem normalen und spezifischen Serum verglichen. Mit dem Serum I ergab sich ein ganz deutlicher Unterschied insofern, als die 10-fache Verdünnung des aktiven Normalserums die Paramäcien nicht schädigte, während die gleiche Konzentration spezifischen Serums neben der Lähmung eine Verquellung der Tiere hervorrief, die bei einer Anzahl innerhalb 24 Stunden zu Zerfliefsungserscheinungen führte; im 10fach verdünnten Normalserum waren die Tiere nach 24 Stunden sämtlich munter, gefräfsig und ihre Zahl war vermehrt. Ein Vergleich der nur 5fachen Verdünnungen ergab für das Normalserum zunächst eine Lähmung ohne tiefgreifende sichtbare Gestaltveränderung, dagegen für das spezifische Serum Zerfliefsungserscheinungen fast aller Individuen; nach 24 Stunden waren die Paramäcien in der Lösung des Normalserums unbeweglich bis auf die undulierende Membran gequollen, mit enormen aufgetriebenen Vakuolen, einige zerplatzt, einige von normalem Ansehen; in der Lösung des spezifischen Serums war die Mehrzahl zerplatzt, die übrigen unbeweglich mit enormen Vakuolen, aber mit strudelndem Peristomfeld, einige in verschiedenen Stadien der Teilung, die Teilungsprodukte hatten ein annähernd normales Aussehen. Es ergibt sich also im Grunde nur ein gradweiser Unterschied in der Wirkung des normalen und des spezifischen Serums: die Schädigung, die das spezifische Serum noch in grofsen Verdünnungen (s. unten) zu bewirken vermag, erzeugt in konzentrierteren Lösungen auch das Normalserum (aufser der Agglutination). Ob die beschriebenen Erscheinungen im konzentrierten Serum in Analogie zu lytischen Vorgängen zu setzen sind, bleibt übrigens fraglich.

Sicher ist, dafs die Zerfliefsungserscheinungen, welche etwas leichter in konzentrierteren Mischungen des spezifischen als des normalen Serums eintreten, in bezug auf ihr Aussehen gegenüber den durch mechanische und chemische Mittel leicht zu bewirkenden Zerfliefsungserscheinungen nicht die geringste Eigentümlichkeit hatten. Es blieb auch zunächst unerklärlich, warum fast nie in denjenigen Verdünnungen, wo die spezifische Wirkung allein sichtbar wurde, Zerfliefsungserscheinungen an den Paramäcien auftraten, es sei denn, dafs man diesen Umstand auf Rechnung des geringen lytischen Wertes des Serums zu setzen hat. Diese Verhältnisse sollen in den Schlufsbetrachtungen noch näher berührt werden. Es ist nötig, hier einen Punkt zu erwähnen, der bei den Versuchen mit Paramäcien immer wieder sich bemerkbar machte, das ist der grofse individuelle Unterschied im Verhalten von Paramäcien derselben Zucht den verschiedensten Eingriffen und Einflüssen gegenüber; er macht es zur unumgänglichen Notwendigkeit, stets mit einer beträchtlichen Anzahl von Individuen zu arbeiten, weil z. B. in einem Dutzend immer ein oder zwei Exemplare sich anders verhalten als die übrigen, welche den Durchschnitt repräsentieren. Da es sich aber immer nur um gradweise Unterschiede dabei handelt, d. h. um erhöhte oder herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber den experimentellen Reizen, so ist der individuelle Unterschied nicht nur nicht mifslich, sondern von Nutzen und in häufigen Fällen ein wertvoller Fingerzeig. Hierfür ein Beispiel: Mit der 20-fachen Verdünnung des Serums I trat bei der gröfsten Mehrzahl der behandelten Paramäcien nur eine einfache Lähmung der Fortbewegung ein; vereinzelte Exemplare blieben aber schwach beweglich, wieder andere hingegen erlitten eine tiefergreifende Lähmung, indem diese sich auf die kontraktilen Vakuolen verbreitete. Mit der Zeit nahm das aufbewahrte Serum an Wirksamkeit ab und nach Wochen war keine vollkommene Lähmung der Bewegung zu erzielen; der Durchschnitt der Paramäcien verhielt sich jetzt wie die mehr empfindlichen Exemplare vor mehreren Wochen. Mit dem frischen starken Serum II waren anderseits nun viel zahlreichere Lähmungen höheren Grades zu erzielen, als seinerzeit

mit dem Serum I, so dafs die damals als Zufälligkeiten erscheinenden Ausnahmen zu gesetzmäfsigen Erscheinungen gestempelt wurden.

Die feineren Vorgänge bis zum Eintritt tiefgreifender Lähmungen sind folgende: es findet zunächst immer zuerst der allmähliche Stillstand der Ortsveränderung auf die oben beschriebene Weise statt; liegen die Tiere still, so ist die weitere Beobachtung natürlich sehr erleichtert; man bemerkt dann auch an den inneren Teilen der Paramäcien zuerst eine Erregung: die Endoplasma-Strömung (»Cyclose«) ist eine sehr lebhafte, die undulierende Membran schlägt aufserordentlich schnell, die Nahrungsvakuolen füllen sich sehr schnell und stofsen sich oft ab, die kontraktilen Vakuolen bleiben zuerst klein und pulsieren mit grofser Frequenz, durchschnittlich 4 mal in 1 Minute (normale Frequenz der Entleerung der kontraktilen Vakuolen ist alle 25 Sekunden bei 16° C). Der Vorgang der Paralysierung kann auf jeder beschriebenen Stufe stehen bleiben; geht er nicht weiter, als bisher beschrieben, so ist es nicht zu verwundern, dafs diejenigen Tiere, deren Stoffwechsel so offenbar gesteigert ist, sich besonders schnell auch von der Lähmung ihrer Fortbewegungsorgane erholen; geht er hingegen weiter, so folgt der Erregung eine Verlangsamung der inneren Bewegungsvorgänge; am auffallendsten ist das seltenere Schlagen und die gleichzeitige diastolische Erweiterung der kontraktilen Vakuolen, welche so enorme Grade erreichen kann, dafs das ganze Tier mifsgestaltet erscheint, indem es in eine von wenig Plasma umgebene Blase verwandelt wird. Dies geschieht dadurch, dafs schliefslich überhaupt keine Entleerung der Vakuolen mehr erfolgt und die normaliter vorhandenen zwei Vakuolen in eine einzige verschmelzen. Sehr häufig ist auch der Fall, dafs sich die sogenannten Bildungsvakuolen nicht mehr in die Haupt-Vakuolen zu entleeren vermögen, so dafs diese letzteren von einem Kranz scheinbar neugebildeter Hohlräume umgeben werden. Bemerkenswert ist, dafs in diesem Stadium noch die Nahrungsaufnahme ungehindert vor sich gehen kann, und dafs die Paramäcien in diesem aufgeblasenen Zustande tagelang leben können. Erst die höchsten Grade der Lähmung ergreifen die undulierende Membran und bedingen den Tod.

Die Hoffnung, eine anatomische Grundlage für die beschriebenen Vorgänge zu finden und sie dadurch des rein funktionellen Charakters zu entkleiden, hat sich nicht erfüllt. Es gelang auch mit den stärksten Vergröfserungen nicht, Veränderungen der Cilien und ihrer Ansatzpunkte zu finden. Zuweilen schienen sie verdickt und verkürzt und an ihren äufsersten Enden mit Anschwellungen versehen. Aber die Täuschung ist dadurch, dafs Bakterien und feinste Bröckel unter dem Einflusse des Serums an ihnen haften bleiben und mit verdickten Enden verwechselt werden können, sehr leicht möglich. Ferner erscheinen die Cilien-Enden, wenn sie von oben gesehen werden, infolge starker Lichtbrechung als Knöpfchen; da nun die Cilien gelähmter Paramäcien wirr durcheinander liegen, so können solche Knöpfchen bei der ungemeinen Feinheit des Objekts leicht eine pathologische Anschwellung benachbarter Cilien vortäuschen. Im ganzen hat man den Eindruck einer falschen Innervation, indem die Cilien an den verschiedenen Stellen der Oberfläche in Gruppen bald schnell, bald langsam, und oft in entgegengesetzten Richtungen schlagen. Die Trichiten werden von den festklebenden Tieren ausgeschleudert, aber sehr häufig nur mangelhaft, so dafs sie von von einem Walde starrer Spiefse umgeben erscheinen; auch bleiben sie oft an ausgestofsenen Trichiten mit den Cilien kleben.

Auch die andere Hoffnung, es würden sich vielleicht bei Behandlung von Paramäcien mit spezifischem Antiserum Wirkungen ergeben, welche ausschliefslich nur durch solches zu erzeugen wären, ist nicht in Erfüllung gegangen. Alle genannten pathologischen Äufserungen des Paramäcien-Organismus lassen sich auch durch chemische Mittel hervorrufen. Es liegen eben dieselben Verhaltnisse vor, wie bei der Hämolyse, welche ebensogut durch chemische und thermische Mittel als durch spezifische Antikörper bewerkstelligt werden kann.

Von der Annahme ausgehend, dafs in den Eigenschaften des Plasmas gesunder einerseits und durch spezifisches Serum gelähmter Paramäcien anderseits Unterschiede bestehen müssen, unternahm ich färberische und andere Versuche, aber ohne bisher ein verschiedenes Verhalten beider zu entdecken. Gerade

beim Vergleich der Zerfliefsungserscheinungen gesunder und spezifisch gelähmter Infusorien hätte man am ehesten erwarten können, Unterschiede zu finden, weil einerseits die Vorgänge der »Zerfliefsung« normaler Infusorien durch die treffliche Arbeit Kölschs (4) wohlbekannt sind und anderseits das Protoplasma hierbei in feineren Beziehungen beobachtet werden kann, als bei irgend einem anderen Vorgang. Bisher haben aber meine Versuche in dieser Richtung keinen Erfolg gehabt: die durch Erwärmung oder durch sanften Druck bewirkte Zerfliefsung spezifisch gelähmter Paramäcien glich vollkommen derjenigen unter gleichen Bedingungen erfolgenden normaler Kontrolltiere. Doch sollen diese Versuche gerade mit Rücksicht auf die osmotische Natur der dabei sich abspielenden Veränderungen gelegentlich wiederholt werden.

Ferner seien die Ergebnisse von Vitalfärbungen spezifisch gelähmter Paramäcien mitgeteilt. Dieselben wurden zu dem gleichen Zwecke unternommen wie die Zerfliefsungs-Versuche, nämlich um etwaige Unterschiede im Verhalten von spezifisch beeinflufsten und normalen Paramäcien gegenüber dem Neutralrot festzustellen. Zu gleichen Mengen Zuchtflüssigkeit mit gelähmten Paramäcien einerseits und gesunden anderseits wurden gleiche Mengen (gewöhnlich 3 Tropfen) verschiedener Verdünnungen einer konzenrierten, wäfsrigen Neutralrotlösung (100-, 5000- und 10000-fache-Verdünnungen) auf Objektträger gegeben, gemischt und ein mit tWachsfüfschen versehenes Deckglas aufgesetzt. Normale Paramäcien wurden durch diesen Zusatz von 100-fach verdünntem Neutralrot in wenigen Stunden, meist unter Zuspitzung des Vorderendes abgetötet, nachdem sie eine anfänglich distinkte, an bestimmte Granula gebundene, dann mehr und mehr diffuse Färbung angenommen hatten. Zuerst stirbt das Vorderende ab. Das absterbende Plasma nimmt im Gegensatz zu dem hochbordeauxrot sich färbenden lebenden mehr und mehr eine ziegelrote bis braunrote Farbe an; schliefslich schwindet überhaupt jede Färbung. Gleichzeitig gehen Zerfliefsungs- und Gerinnungserscheinungen an den Körpern der Paramäcien vor sich. Der Zusatz einer 5000-fachen Verdünnung der Neutralrotlösung bewirkt eben-

falls zunächst eine isolierte Färbung der Nahrungsvakuolen-Wände und gewisser Granula am hinteren Körperpol. Je mehr mit dem Fortgang der Verdauung die Nahrungsvakuolen kleiner werden, desto intensiver färbt sich der Inhalt. Allmählich verbreitet sich die Granulafärbung nach vorn und meist tritt auch eine Färbung der warzenförmigen Vorsprünge der Pellicula zwischen den Cilienansätzen, wahrscheinlich durch eine rein mechanisch durch die Wimperbewegung bedingte Ansammlung des Farbstoffs ein. Nach 6 Stunden liegen die Paramäcien bei Anwendung der 5000-fachen Verdünnung still, nach 24 Stunden sind sie sämtlich darin abgestorben. Der Zusatz von 10000-fach verdünnter Neutralrotlösung hatte eine noch gröfsere Verlangsamung der Vitalfärbung zur Folge, so dafs noch nach 24 Stunden einzelne distinkt gefärbte Individuen am Leben waren. Diese selben Färbungen, in derselben Konzentration und gleichzeitig angewandt, hatten nun bei spezifisch gelähmten Paramäcien nicht denselben Erfolg. Je intensiver nämlich die Tiere gelähmt waren, desto geringer war die eintretende Färbung, desto langsamer trat sie ein, wenn sie überhaupt statt hatte. Der Zusatz von 100-facher Verdünnung des Neutralrots, welcher gesunde Paramäcien in kurzer Zeit tötet, hatte bei gelähmten nach 4 Stunden lediglich den ersten Grad der Farbstoffwirkung erzeugt, nämlich die distinkte Färbung der Vakuolen-Wände und der umliegenden Granula des Hinterendes. Noch nach 24 Stunden befanden sich die gelähmten Paramäcien am Leben, jetzt allerdings diffus gefärbt und gequollen. Die 10000-fache Verdünnung hatte bei gut gelähmten in dieser Zeit noch keine Färbung zu erzielen vermocht. Als der gleiche Versuch mit solchen Paramäcien angestellt wurde, welche z. T. bereits die Lähmung fast überstanden hatten, ergab sich eine geringere Verzögerung der Färbung gegenüber den gelähmten Paramäcien; die Erscheinung war ganz konstant: je mehr ein Tier die Vergiftung überwunden und je mehr es beweglich geworden war, desto mehr glich es in bezug auf seine Färbbarkeit mit Neutralrot den gesunden Paramäcien. Ob die besonders dunkelrote Färbung, welche einige Male bei immun gewordenen Paramäcien auffiel, auf einer Gesetzmäfsigkeit beruht, mufs noch dahingestellt

bleiben und soll bei Gelegenheit weiter untersucht werden. Wie die obigen Befunde von der geringen Farbstoffaufnahme durch spezifisch gelähmte Paramäcien zu deuten sind, ist nicht klar. Jedenfalls ist sie, wie aus einem Kontrollversuche hervorgeht, nicht allein auf Rechnung der lähmenden Substanz im spezifischen Serum zu setzen: Denn auch inaktives Normal-Serum vom Kaninchen, welches in den angewandten Konzentrationen absolut keine sichtbare Wirkung auf die Paramäcien auszuüben scheint, verzögerte die Vitalfärbung erheblich, wenn auch nicht in dem Mafse wie das spezifisch-toxische Serum.

Zum Schlusse sei noch bemerkt, dafs das Antiparamäcien-Serum ebenso im Dunklen als im Hellen auf die empfindlichen Tiere lähmend einwirkt.

Die lähmende Wirkung des Antiparamäcien-Serums läfst sich mit blofsem Auge verfolgen, wie sich gleich bei einem der ersten Versuche ergab, der den Zweck hatte, die Wirkungen von aktivem spezifischem, inaktivem spezifischem, aktivem normalem und inaktivem normalem Kaninchenserum auf die Paramäciken in 20facher Verdünnung zu vergleichen. Die Proben wurden in Reagenzgläsern angesetzt, und es liefs sich mit unbewaffnetem Auge verfolgen, wie in dem aktiven spezifischen Serum und in dem auf 53° ½ Stunde lang erhitzten spezifischen Serum die Flüssigkeit mehr und mehr entvölkert wurde und sich klärte, indem die darin befindlichen Paramäcien gelähmt zu Boden sanken und gleichzeitig auch die Bakterien zu grofsen Haufen agglutiniert wurden, die sich ebenfalls in der untersten Schichte ansammelten. Im aktiven Normalserum sanken anfänglich ebenfalls die meisten Paramäcien zu Boden, erholten sich aber schnell und kamen wieder empor. Die Probe mit inaktivem Normalserum dagegen blieb in allen Schichten gleichmäfsig bevölkert. Die mikroskopische Kontrolle zeigte, dafs im inaktiven Normalserum die Paramäcien nach schnell vorübergehenden Wirbelbewegungen, welche wohl durch die veränderten osmotischen Verhältnisse bedingt sind, sich vollkommen unbeeinflufst zeigen.

Aus dem Gesagten geht hervor, dafs die halbstündige Erwärmung auf 53° diesem Serum die Fähigkeit, zu lähmen, nicht geraubt hatte. Auch die einstündige Erhitzung auf 53° vermochte dies nicht, wohl aber genügte eine darauffolgende Erhitzung auf 55—56° (vergl. die einschlägigen Angaben bei Serum III). Merkwürdigerweise liefs sich aber das einmal inaktivierte Serum durch Zusatz von aktivem Normalserum nicht wieder aktivieren. Ebenso war die Wirksamkeit durch Alexinzusatz nicht wieder herzustellen, wenn das spezifische Serum sie nach Monaten spontan eingebüfst hatte.

Die Intensität der Wirkung in bezug auf die Zahl der gelähmten Paramäcien und in bezug auf den Grad der Lähmung bei den einzelnen war der Menge des jeweils verwendeten Serums proportional, ebenso die Zeit, in welcher die Lähmung eintrat. Durch ganz schwaches Serum wurden nur die empfindlicheren Individuen beeinflufst. Je intensiver die Lähmung war, desto länger hielt sie an, aber noch 5 Tage lang gelähmte Paramäcien waren am Leben und konnten sich erholen. Sie erholten sich rascher, wenn sie nach Eintritt der Lähmung von dem umgebenden Serum befreit, d. h. in Wasser gebracht wurden. Doch hielt auch hier die Wirkung tagelang an, was wohl dafür spricht, dafs eine Regeneration wirklich geschädigter Teile erst notwendig war. Bei der Temperatur von 37° trat die lähmende Wirkung rascher als bei Zimmertemperatur ein, anfänglich konkurriert hier aber die erregende Wirkung der Wärme mit der Wirkung des Serums in der Weise, dafs das Exzitationsstadium länger andauert als bei den Kontrolltieren (Serumwirkung bei 16° C), aber dann wird die Lähmung um so schneller vollkommen.

Die Paramäcien verhielten sich dem spezifischen Serum gegenüber negativ chemotaktisch; diese Tatsache wurde in der Weise festgestellt, dafs der unter einem gestützten Deckgläschen befindliche Raum zur einen Hälfte mit bestimmten Verdünnungen des spezifischen Serums, zur anderen Hälfte mit Paramäcienzucht gefüllt wurde. Die Flucht der Tiere an den dem spezifischen Serum entferntesten Teil des zur Verfügung stehenden Raumes bewies die negative Chemotaxis. Im Gegensatz dazu trat bei

Auffüllung der einen Hälfte mit indifferenten Medien sehr bald gleichmäfsige Verteilung der Paramäcien in den beiden Deckglashälften ein.

Ein Verbrauch wirksamer Substanz war bei den doch verhältnismäfsig geringen Mengen Paramäcien, die in Berührung mit dem Serum kamen, nicht festzustellen. Wenigstens wirkte der Abgufs nach gelungenem Lähmungsversuch anscheinend ungeschwächt auf mehrere frische Portionen Paramäcien. In starken Verdünnungen wirkten die Sera erst nach Stunden und Tagen.

So trat eine Erlahmung in dem 100fach verdünnten Serum Nr. II erst nach Stunden ein, und nach 4 Tagen fanden sich sogar im 400fach verdünnten Serum die meisten Paramäcien vollkommen gelähmt und an ihre Nachbarschaft festgeklebt. Die gleichzeitig angesetzten Proben mit schwächeren Verdünnungen (50—200fach) beherbergten fast nur zerflossene und geronnene Paramäcien nach dieser Zeit; doch ist die Deutung dieses Befundes im Sinne eines mittlerweile schon eingetretenen lytischen Prozesses nicht einwandfrei, da ja die aseptische Vornahme dieser Versuche nicht möglich ist und durch Zusammenbringen der Paramäcienzucht mit den verschiedenen Serummischungen reichliche Fäulnis der letzteren eintritt, so dafs das Absterben der Paramäcien auf diese bezogen werden kann. Noch gröfsere Wahrscheinlichkeit aber hat die Annahme, dafs es durch die auf die Organe der Ernährung übergreifende Lähmung bedingt ist.

Antiglaukoma-Serum.

Ein 335 g schweres Meerschweinchen erhielt im Zeitraum von zwei Monaten acht subkutane Injektionen zentrifugierter Reinzuchten des Glaukoma scintillans Ehbg.; es befand sich in den Reinzuchten nur eine einzige Bakterienart. Das Tier vertrug die Injektionen ohne Abszefsbildung und behielt sein ursprüngliches Körpergewicht.

Die Schilderung der Wirkung dieses Serums kann kurz gefafst werden, da sich den Antiparamäcien-Seris vollkommen analoge Beobachtungen ergaben. In höheren Konzentrationen war

zwischen der Wirkung normalen Meerschweinchen-Serums und der des spezifischen Serums kein deutlicher Unterschied zu erkennen. Erst die 20fache Verdünnung des Normalserums erwies sich unschädlich für Glaukoma und damit begann der Bereich der spezifischen tonischen Wirkung beim Serum des behandelten Tieres. Die höheren Verdünnungen des spezifischen Serums verhielten sich wie folgt:

20-fache Verdünnung: sofort eintretende Bewegungsstörungen, Rückwärtsrollen, nach 8 Minuten nur noch schwache Beweglichkeit, nach 14 Minuten Verklebung mit Bakterien und vollständiger Stillstand, nach 25 Minuten einseitige (»Thränenform«) oder allgemeine Abrundung der Gestalt Nach 24 Stunden einzelne zu Kugeln mit deutlich hervortretendem Kern geronnen; die übrigen liegen in vollkommener Lähmung still.

40-fache Verdünnung: sofortige Bewegungsstörung, nach 8 Minuten nur noch schwache Ortsveränderung, nach 15 Minuten fast völliger, nach 45 Minuten vollständiger Stillstand bei normaler Form. Nach 24 Stunden merkwürdige Gröfsenunterschiede (allgemeine Quellung oder abnormes Wachstum?). Vereinzelte schwache Bewegungen.

80-fache Verdünnung: Fast sofort bewirkte Drehbewegung; nach 10 Minuten meist Stillstand; wenn wieder eintretende Bewegung, dann immer Rückwärtsrotation, nach 45 Minuten Stillstand; die meisten erhalten »Thränenform« (ein Körperpol zugespitzt, der andere abgerundet). Nach 24 Stunden wieder eingetretene Beweglichkeit; die meisten aber bleiben schwach am Boden der Gefäfse; Gröfsenunterschiede!

160-fache Verdünnung: Nach 3 Minuten die erste rollende Bewegung; nach 5 Minuten schwache, ruckweise Bewegungen fest am Platze; innerhalb 30 Minuten sinken sämtliche Tiere zu Boden, ohne die Fähigkeit der Fortbewegung ganz zu verlieren. Nach 24 Stunden normale Beweglichkeit wieder hergestellt; keine bedeutenden Gröfsenunterschiede zwischen den einzelnen Tieren.

320 fache Verdünnung: Innerhalb 15 Minuten keine Bewegungsstörung, nur allmähliches Absinken zu Boden, Ausführung nur kleiner Bewegungen. Nach 24 Stunden Tiere vollkommen unbeeinflufst.

Durch halbstündiges Erhitzen auf 56° verlor das Serum die Fähigkeit, Glaukoma zu lähmen, nicht aber die Fähigkeit der »Agglutination:« Die Glaukoma blieben allerorts mit ihren Cilien kleben. Die sonstigen feineren Veränderungen der Tiere durch das aktive Serum (Cilienstillstand, lebhafte Körnchenströmung) glichen vollkommen den Beobachtungen bei den Paramäcien.

Das Meerschweinchen ging bei einem Versuche, die Veränderungen und Schicksale der Glaukoma in der Bauchhöhle des immunisierten Tieres zu studieren, zugrunde.

Antiparamäcien-Serum Nr. III.

Von den bisherigen Erfahrungen in dieser Untersuchungsreihe schien das Fehlen von eigentlichen lytischen Stoffen in den spezifischen Seris die auffallendste. Es war nicht unmöglich, diese Tatsache der im allgemeinen weniger wirksamen subkutanen Injektion zur Last zu legen. Allein es war ja wegen der Natur des Injektionsmaterials nicht angängig, die intraperitoneale Einspritzung zu versuchen. Deshalb war es sehr willkommen, in dem kürzlich von Löffler (8) mitgeteilten »neuen Verfahren zur Gewinnung von Antikörpern« eine Methode kennen zu lernen, welche die Einbringung der Paramäcien samt den ihnen anhaftenden Bakterien in die Bauchhöhle ermöglichte. Sie besteht in der Erhitzung des sorgfältig getrockneten Antigens. Für die Paramäcien gestaltete sich die Gewinnung eines wirksamen und bei intraperitonealer Injektion ungefährlichen Materials in folgender Weise: Möglichst dichte Reinzuchten wurden vollkommen abzentrifugiert, der Brei von Paramäcien in sterilen Petrischalen ausgestrichen und dann im Vakuum oder über Schwefelsäure sorgfältig getrocknet. Man erhielt dann an den dickeren Stellen fettig glänzende graugelbe Schüppchen, bei guter Verteilung in den Schalen nach Ablösung mit einem Messer ein lockeres feines Pulver. Nun wurde im Trockenschranke $^1/_2$ Stunde erhitzt; nach dem Abkühlen wurde das so sterilisierte Material mit NaCl-Lösung versetzt, wobei es sich schlecht benetzte, und dann einem Kaninchen intraperitoneal eingespritzt. Das Tier erhielt innerhalb drei Wochen acht derartige Injektionen, wobei sein Gewicht von 3090 g auf 2570 abnahm. Die jedesmalige Dosis an Paramäcientrockensubstanz wurde genau gewogen, zwecks Orientierung über die aus guten Paramäcien-Zuchten gewinnbaren und der zur Immunisierung erforderlichen Mengen. Im ganzen erhielt das Tier 150 mg Paramäcien-(+ Bakterien)-Trockensubstanz. In 1 Liter

dichter Paramäcienzucht sind höchstens 30 mg Trockensubstanz an Paramäcien und Bakterien). 6 Tage nach der letzten Injektion wurde dem Tiere Blut entzogen. Das Serum erwies sich als wirksam, obwohl anscheinend nicht in dem Grade als die vorigen Sera (trotz Verwendung gröfseren Impfmaterials). Seine physiologischen Wirkungen waren die gleichen wie die der anderen Sera. Dagegen unterschied es sich in einer höchst merkwürdigen Weise von jenen dadurch, dafs es sich nicht inaktivieren liefs: bei halbstündiger Erhitzung auf 70° wurde es, wie jedes andere Serum trüb opaleszierend, büfste aber seine lähmende Wirkung nicht ein. Bei weiterer Erhitzung, gegen 80°, gerann es allmählich.

Auch diesmal wurde die Wirkung des unverdünnten spezifischen Serums verglichen mit der des unverdünnten Normalserums: die Paramäcien starben in beiden innerhalb derselben Zeit, nämlich in $1\frac{1}{2}$—3 Minuten, indem Kern und Plasma geronnen. Der einzige Unterschied, der bemerkt wurde, bestand darin, dafs im spezifischen Serum nach eingetretenem Tode an vielen Individuen nach eine Abhebung der Pellicula von dem Endosarke zu beiden Seiten des Tieres durch eine erst postmortal eintretende Flüssigkeitsansammlung eintrat.

Die Wirkung des verdünnten spezifischen Serums (gewöhnlich wurde die 40fache Verdünnung verwendet) hielt meist bei ausschliefslicher Lähmung der Fortbewegungsorgane, mehrere Tage an; vom dritten Tage an mehrten sich die wieder beweglich gewordenen Tiere und von Tag zu Tag konnte man verfolgen, wie die Zahl der gelähmten sank und diejenige der in den oberen Schichten der Flüssigkeit frei herumschwimmenden zunahm. Dies konnte nicht anders erklärt werden als dadurch, dafs vermöge des während der äufseren Lähmung unbehindert vor sich gehenden Stoffwechsels die Vergiftung überstanden wird und die geschädigten Teile regeneriert werden. Damit erhob sich die Frage, ob durch ein derartiges Überstehen der Vergiftung gegenüber einer wiederholten Vergiftung ein veränderter Zustand geschaffen wird, also vielleicht Überempfindlichkeit oder Immunität eintritt. Schon der erste Versuch bewies eine ganz auffallende Herab-

setzung der Empfindlichkeit gegenüber dem spezifischen Serum: eine Reihe Paramäcien, welche vor 3 Tagen gelähmt worden waren, und von denen sich die Hälfte erholt hatte, während die andere Hälfte sich noch in gelähmtem Zustande befand, wurden mit Wasser vorsichtig von Resten des alten Serums gewaschen und nach dem Zentrifugieren in eine frische Uhrschale gesetzt, in der die gelähmten sofort zu Boden sanken unter bald aufhörenden, ruckweisen Versuchen zur Fortbewegung, während die gesundeten Tiere in den oberen Schichten herumschossen. Zur Kontrolle wurden normale Paramäcien auf ganz die gleiche Weise behandelt und in eine zweite Uhrschale gebracht. Beide Proben wurden nun mit der gleichen Menge spezifischen Serums versetzt, sodafs eine 40fache Verdünnung derselben entstand, durch vorsichtige Mischung mittels steriler Pipetten. Während die normalen Paramäcien binnen wenigen Minuten der lähmenden Wirkung unterlagen, blieben diejenigen Paramäcien, die sich von der ersten Vergiftung vollkommen erholt hatten, ganz munter, und erst ungefähr nach 1 Stunde sanken einige wenige davon nach abwärts, ohne die wilden Bewegungsstörungen zu zeigen, mit denen bei normalen Tieren sonst die Serumwirkung eingeleitet wird. Was die Paramäcien dieser Probe betrifft, welche sich noch in gelähmtem Zustande befanden, so schien die zweite Dosis des spezifischen Toxins die Vergiftung eher zu verstärken, indem bei einigen die tiefer greifende Lähmung der Vakuolen und des Peristomfeldes eintrat Der eben beschriebene Versuch wurde in verschiedener Weise, aber immer mit demselben Resultate wiederholt; u. a. wurde gezeigt, dafs Paramäcien, welche eine zweimalige Vergiftung überstanden hatten, auch gegen eine erhöhte Giftkonzentration nur 20fache Verdünnung nach zweimaliger Behandlung mit 40fachen Verdünnungen) ohne Ausnahmen ganz unempfindlich geworden waren.

Zusammenfassung.

Die vorliegenden Untersuchungen waren zum Zwecke morphologischer Studien unternommen worden. Wenn sie nun auch bisher gerade nach dieser Richtung keine Resultate gehabt haben,

so bieten ihre Ergebnisse doch vielleicht in bezug auf theoretische Fragen der Immunitätslehre und in bezug auf die Klinik der durch Protozoen verursachten Infektionskrankheiten einige interessante Hinweise. Systematische Versuche über Immunisierung gegen Protozoen liegen bisher nicht vor. Die einzigen Angaben, welche über die Einwirkung eines spezifischen Serums auf Protozoen existieren, stammen von Laveran und Mesnil (7) und sind verzeichnet in ihren Untersuchungen über die Trypanosomiasis der Ratten. Auch die klinische Seite der Frage war vollkommen unbearbeitet und unsicher bis in die jüngste Zeit; wufste man ja nicht einmal für die seit altersher bekannte Malaria gewifs, ob ihre Überstehung eine Immunität verschaffte, wie viel weniger für diejenigen menschlichen und tierischen Seuchen, welche noch nicht lange bekannt sind und deren Natur noch später als die der Malaria erkannt worden ist. Bevor R. Koch (3) im Jahre 1900 an einem einwandsfreien Krankenmaterial feststellte, dafs es eine erworbene Immunität nach Malariaerkrankung gibt, war gerade die entgegengesetzte Meinung die herrschende, dafs nämlich das Überstehen der Malaria gegenüber einer Reinfektion empfänglicher mache. Koch hat dann auch in Übereinstimmung mit Smith und Kilborne die Mitteilung gemacht, dafs beim Texasfieber eine Immunität erworben wird (zit. nach Kossel (5). Es besteht zwischen dieser Protozoen-Infektion und der Malaria darin noch eine besondere Ähnlichkeit, dafs gerade die Durchseuchung in früher Jugend einen wirksameren Schutz als das Überstehen in späterem Lebensalter verleiht. Seitdem mehren sich die Angaben über die Möglichkeit der Erwerbung aktiver Immunität bei Protozoen-Infektionskrankheiten. Inwieweit diese Frage durch obige Untersuchungen über Immunisierung gegen Infusorien und Flagellaten berührt wird, darauf soll weiter unten eingegangen werden.

Schon 1899 haben L. Rabinowitsch und Kempner (14) gelungene Übertragungsversuche von Trypanosomen grauer Ratten auf weifse Ratten ausgeführt und mitgeteilt, dafs die weifsen und geschecktén Ratten, welche sich niemals spontan mit Trypanosoma Lewisi infizieren, durch die einmalige Impfung eine aktive

Immunität erwerben, ferner dafs das Serum solcher weifsen Ratten anderen bei der Infektion Schutz verleiht (passive Immunität) Doch konnten Rabinowitsch und Kempner keine für die Parasiten schädlichen Wirkungen des Immun-Serums erkennen: Weder Agglutination noch Entwicklungshemmung. Demgegenüber stellten Laveran und Mesnil (l. c.) fest, dafs das Serum von Ratten, welche eine oder mehrere Injektionen von Trypanosomen erhalten hatten, eine »Agglomeration« der Flagellaten erzeugte. Gewöhnlich trat vor der Häufchenbildung keine Immobilisation ein. Eine lähmende Wirkung gewann das Serum überhaupt nur bei langedauernder und forcierter Immunisierung mit Trypanosoma; auch dann erschien der paralysierende Erfolg nur bei Anwendung stärkerer Konzentrationen (z. B.: eine Ratte hatte in sieben Monaten 13 Impfungen erhalten; ihr Serum lähmte nur noch in 10facher Verdünnung). Die agglutinierten Trypanosomen sind in den Seris von gewöhnlicher Stärke ebenso beweglich wie die isolierten gesunden. Indem sie mit dem geifsellosen Hinterende verkleben, bilden sie, oft in Dutzenden, Rosetten, an deren Peripherie die Geifseln lebhaft schlagen. Nie sahen sie die geringste morphologische Veränderung an den agglomerierten Trypanosomen. Diese blieben trotz Agglutination am Leben und infektiös. Nie vermochten sie eine Auflösung der Flagellaten durch das Serum zu konstatieren.

Vergleicht man mit diesen Angaben die obige Schilderung der Wirkung meiner Anti-Infusorien- und Anti-Flagellaten-Sera, so ergibt sich eine Übereinstimmung in der Art ihrer Wirkungen und Unterschiede nur in den Graden der verschiedenen Wirkungsweisen. Während bei meinen Seris sowohl für die Infusorien (Paramäcium caudatum und Glaukoma scintillans) wie für das kleine Flagellat, Chilodon paramäcium, die lähmende Wirkung weit überwog, trat in jenem Anti-Trypanosomen-Serum die agglutinierende Wirkung in den Vordergrund. Auch war die Stärke der Sera erheblich verschieden: diejenigen von Laveran und Mesnil agglutinierten höchstens noch in 50facher Verdünnung (lähmten höchstens noch in 10facher Verdünnung); ich beobachtete lähmende Wirkung noch in 400facher

Verdünnung. Gemeinsam ist die Feststellung, dafs es unmöglich ist, morphologische Veränderungen an den beeinflufsten Protozoen ausfindig zu machen, dafs niemals Auflösungserscheinungen zu sehen sind (welche an die Bildung lytischer Antikörper denken liefsen), und dafs die tatsächlich gewonnenen Antikörper paralysierender und agglutinierender Natur die Protozoen gar nicht oder kaum schädigen. Dies ist ein neuer Beweis für die wichtige Tatsache, dafs wir nicht berechtigt sind, diese Antikörper als Schutzstoffe zum Zwecke der Überwindung der parasitären Protozoen anzusehen; es verbietet sich also die teleologische Auffassung der Antikörperproduktion, wenigstens soweit es sich um die paralysierenden und agglutinierenden Stoffe handelt; wenn, wie Laveran und Mesnil gesehen haben, die Trypanosomen in der Bauchhöhle des immunen Tieres lange am Leben bleiben, so weist dies darauf hin, dafs ihre endgültige Beseitigung auf anderem Wege zustande kommen mufs als durch die schädigende Wirkung der Körpersäfte. Tatsächlich haben die französischen Autoren beobachtet, dafs die Vernichtung der Parasiten allein durch Phagocytose bewerkstelligt wird.

Es ist fraglich, ob bei der natürlichen Erwerbung einer aktiven Immunität gegen Protozoen je so stark wirksame Sera zustande kommen, als ich sie durch künstliche Immunisierung erhielt. Wäre dies der Fall, so wäre ja allerdings, wie wir gesehen haben, die Möglichkeit gegeben, dafs die Parasiten infolge tiefergreifender Lähmung (Lähmung der exkretorischen und metritorischen Apparate) durch die spezifische Säftewirkung absterben. Aber es mufs auch daran erinnert werden, dafs die bisher bekannten parasitischen Protozoen fast ohne Ausnahme sich auf andere Weise ernähren als diejenigen, die ich als Antigene benutzt habe, so dafs ein Analogie-Schlufs von Paramäcien auf parasitische Protozoen nicht ohne weiteres zulässig ist.

Auf die Besonderheit der »Agglutination« durch die Antiparamäcien- und Antiglaukoma-Sera mufs noch mit einigen Worten eingegangen werden. Am auffallendsten war, dafs niemals die spezifischen Zellen miteinander verklebten, sondern immer nur mit den Gefäfs-Wänden oder mit den anderen zur Immunisation

verwendeten Zellen (Bakterien, Chilodon, Paramäcium). Befanden sich Lebewesen in der Zucht, die nicht als Antigen gedient hatten, so blieben die Paramäcien oder das Chilodon niemals an ihnen haften. Dies erinnert an Beobachtungen von Bordet und von Kraus (zit. nach Paltauf (13)), wonach bei Gemengen von zweierlei Blutkörperchenarten Zusatz von für die eine Art spezifischem Serum nur eben diese miteinander verkleben liefs. Die spezifisch beeinflufsten Blutkörperchen blieben niemals an den normalen hängen.

Obwohl die Paramäcien meist mit einem ihrer Körperpole haften blieben, so war doch keine ausschliefsliche Beteiligung bestimmter Körperstellen bei der Agglutination zu beobachten wie etwa bei den Trypanosomen. Die makroskopische Beobachtung der Serumwirkung gegenüber den Paramäcien erinnerte sehr an den englischen Ausdruck für Agglutination: sedimentation, weil im Vordergrunde der sich im spezifischen Serum abspielenden Vorgänge die Lähmung und hierdurch bedingte Absinken der Protozoen stand. Schon den ersten Beobachtern der Agglutination fiel der Verlust der Eigenbewegung als stetes Begleitsymptom der Häufchenbildung auf (Gruber und Durham, Bordet, Metschnikoff).

Das Fehlen von lytischen Stoffen in cytotoxischen Seris und das Vortreten von paralysierenden Eigenschaften scheint sehr oft Hand in Hand zu gehen; wenigstens ist dies für die Spermotoxine durch Landsheimer (6), Metschnikoff (11) und Moxter (12), für Antisera gegen Flimmerepithelien durch v. Dungern (1) bekannt. Es trifft also nach den bisherigen Erfahrungen auch für die Antisera gegen Protozoen zu. Es wäre von Interesse zu sehen, ob man durch Immunisierung gegen Amöben, welche keine speziellen Bewegungsorgane besitzen, weniger lähmende und dafür lytische Antikörper erhält. Was die Leukozyten betrifft, so habe ich keine Angaben darüber finden können, ob durch ein Leukozytotoxin (Metschnikoff l. c., Funck, (2) die Bewegungsfähigkeit der weifsen Blutzellen aufgehoben wird.[1]) Es

---

1) Nach einer Mitteilung von Prof. Gruber ist dies der Fall.

sind nur Aufhellungen und Kernveränderungen beschrieben. Es ist auffallend, daſs gerade die mit kräftigen Bewegungen begabten Zellen, zur Immunisierung verwendet, die Bildung vorwiegend paralysierender Antikörper auslösen. Eine Erklärung läſst sich dafür nicht geben. (Doch mag daran erinnert werden, daſs wenigstens die freilebigen unter ihnen entsprechend der Fähigkeit der schnellen Fortbewegung und der hohen Ausbildung der Bewegungsorgane eine andere Ernährungsweise besitzen als z. B. die Bakterien, von welchen man Lysine erhält. Vielleicht sind es die eigenartigen Enzyme der Verdauung, welche als Antigene in besonderer Weise wirken. Für die Paramäcien ist ein diastatisches Ferment von Mesnil und Mouton (9) nachgewiesen worden).

Negativ wie die Versuche, morphologische Eigentümlichkeiten an den spezifisch beeinfluſsten Zellen zu entdecken, fielen die Experimente aus, welche den Zweck hatten, zu prüfen, ob geringe Dosen des paralysierenden Serums etwa lediglich eine stimulierende Wirkung besäſsen. Dies war nicht der Fall. Das gleiche negative Resultat verzeichnet übrigens Metschnikoff (l. c.) für die gleichen Versuche mit geringen Dosen von spermotoxischem Serum. In beiden Fällen verlängerte sich mit abnehmender Dosis des spezifischen Giftes nur die Zeit bis zum Eintritt der Lähmung.

Was die merkwürdige Beobachtung betrifft, daſs das Serum III sich der paralysierenden Wirkung auch durch halbstündiges Erhitzen auf über 70° C nicht berauben lieſs, so steht sie meines Wissens einzig da. Die anderen Antiparamäcien-Sera lieſsen sich durch einstündiges Erhitzen auf 56° der lähmenden und agglutinierenden Eigenschaften berauben. Worin die Verschiedenheit der Sera begründet liegt, ist nicht zu sagen (das Material für das Serum III war in der Wärme gezüchtet und nach der Löfflerschen Methode behandelt worden). Daſs übrigens Sera mit vorwiegend paralysierenden Eigenschaften sich der Erhitzung gegenüber anders verhalten als die gewöhnlichen lytischen Sera, geht aus Angaben von Laveran und Mesnil (l. c.) hervor: Die Erwärmung des Antitrypanosomenserums auf 55° zerstörte

nur halb dessen lähmende Eigenschaften, selbst die Erwärmung auf 64° vermochte dies nicht vollständig, während bei 64° die Agglutinine vollständig zugrunde gegangen waren. Moxter (l. c.) berichtet, dafs die lähmende Wirkung seines Spermotoxins durch $1^1/_2$—2 stündiges Erhitzen auf 58° verschwand.

So viel über die Wirkungen und die Eigenschaften der spezifischen, gegen Protozoen gerichteten Sera, soweit sie bis jetzt bekannt sind. Was die gegen diese Sera von seiten der Protozoen erwerbbare Immunität betrifft, so ist durch meine obigen Versuche sichergestellt, dafs eine solche, wenigstens bei den Paramäcien, sehr leicht eintritt. Diese Tatsache dürfte, wenn sie in gleicher Weise für parasitische Protozoen konstatiert wird, von klinischer Bedeutung sein, indem es bei spontaner Infektion mit krankheitserregenden Protozoen für den Verlauf der Krankheit mafsgebend sein wird, welcher von den beiden Organismen sich zuerst eine wirksame Immunität gegen die ihm schädlichen Stoffe des anderen verschafft. Jedenfalls darf man daran denken, dafs die Chronizität mancher und die Unheilbarkeit mancher Infektionskrankheiten, insbesondere der durch Protozoen verursachten, darauf beruhen kann, dafs die pathogenen Keime gerade gegenüber den vom Organismus produzierten, spezifisch gegen sie gerichteten Säften aktive Immunität erwerben können.

Literatur.

1. v. Dungern, Immunserum gegen Epithel. Münchener med. Wochenschrift, 1899, Bd. 38.
2. Funck, Das antileukozytäre Serum. Zentralbl. f. Bakt., 1900, Bd. 27.
3. R. Koch, Deutsche med. Wochenschrift, 1900, Bd. 49 u. 50.
4. Kölsch, Untersuchungen über die Zerfließungserscheinungen der ciliaten Infusorien. Zool. Jahrbücher, 1902, Bd. 16, S. 273.
5. Kossel, Die Hämoglobinurie der Rinder. Kolle Wassermann, Handbuch der path. Mikroorganismen, Bd. 1.
6. Landsteiner, Zur Kenntnis der spezifischen auf Blutkörperchen wirkenden Sera. Zentralblatt f. Bakt., Bd. 25, S. 547.
7. Laveran u. Mesnil, Recherche sur le trypanosome des rats. Ann. de l'Inst. Past., 1901, Bd. 15, S. 690.
8. Löffler, Über ein neues Verfahren zur Gewinnung von Antikörpern. Deutsche med. Wochenschrift, 1904, 30. Jahrgang, Nr. 52.
9. Mesnil u. Mouton, Sur une diastase protéolytique extraite des infusoires ciliés. Compt. rend. Soc. de Biologie, 1903, T. 55, p. 1016.
10. Metschnikoff, Etudes sur la resorption des cellules. Ann. Inst. Past., 1899, Bd. 13, S. 741.
11. Metschnikoff, Immunité, 1902.
12. Moxter, Über ein spezifisches Immunserum gegen Spermatozoen. Deutsche med. Wochenschrift, 1900, 14.
13. Paltauf, Agglutination. In Kolle-Wassermanns Handbuch, Bd. 4.
14. Rabinowitsch u. Kempner, Z. f. Hygiene, 1899, Bd. 30, S. 251.
15. Rößle, Morphologische Veränderungen der roten Blutkörperchen durch inaktiviertes, spezifisch lytisches Blutserum. Münchener med. Wochenschrift, 1904, Nr. 42.

Studien zur relativen Photometrie.[1]

III. Teil.

Vom

Dozenten Dr. **Stan. Růžička.**

(Aus dem k. k. Hygienischen Institute des Prof. Dr. Gustav Kabrhel in Prag.)

Ich habe in meiner früheren Arbeit[2]) gezeigt, dafs der Lichtcharakter einzelner Arbeitsplätze (z. B. in der Schule) in bezug auf das Taglicht am besten in der folgenden Art für hygienische Zwecke fixiert und ausgedrückt werden kann: Man liest an einem nebligen dunklen Tage — bei gleichmäfsig diffus leuchtendem Himmelsgewölbe — gleichzeitig die Lichtintensität des zu beurteilenden Arbeitsplatzes und des Himmelsgewölbes im Zenit mittels eines Photometers ab und berechnet das Verhältnis dieser zwei Intensitäten. So findet man z. B., dafs ein Platz nur 1% der gleichzeitigen Lichtintensität des Himmelsgewölbes aufweist, ein anderer 2%, ein dritter 5%.

Welchen Wert hat eine solche Angabe für die hygienische Beurteilung des betreffenden Arbeitsplatzes in bezug auf seine Taglichtbeleuchtung?

Es ist nötig, sich zu vergegenwärtigen, dafs das Grunderfordernis der Hygiene in bezug auf die Taglichtbeleuchtung

---

1) Vorgelegt der Böhm. Kaiser Franz-Josephs-Akademie in Prag am 7. April 1905.

2) Dieses Archiv, Bd. 51.

so lautet, dafs die absolute Lichtintensität eines Arbeitsplatzes niemals unter eine bestimmte Minimalgröfse sinken darf, als welche im allgemeinen für gewöhnliche Schularbeiten die Intensität von etwa 20—25 Meterkerzen angenommen wird.

Wir wollen uns nun vorstellen, dafs man wüfste, innerhalb welcher Grenzen sich die Lichtintensität des Himmelsgewölbes binnen des ungünstigsten — in bezug auf die Taglichtintensität — Jahresteiles während der Unterrichtsstunden bewegt.

Nehmen wir an, dafs die Lichtintensität des Himmelsgewölbes an den dunkelsten nebligen Tagen (aufser der ausnahmsweise stark dunklen Tage) nicht unter 2000 Meterkerzen sinken würde.

Es ist klar, dafs dann ein Arbeitsplatz, an welchem wir mittels meiner Methode — der relativen Photometrie — bei gleichmäfsig diffus leuchtendem Himmelsgewölbe den Quotienten 1% gefunden haben (welcher bedeutet, dafs am Arbeitsplatze eine hundertmal kleinere Lichtintensität als am Himmelsgewölbe abgelesen wurde), bei solcher »minimaler« Tageslichthelligkeit (die Intensität des Himmelsgewölbes = 2000 Meterkerzen), die Lichtintensität von 20 Meterkerzen, also die noch minimal zulässige haben wird. Ferner ist es klar, dafs Arbeitsplätze, welche einen kleineren Quotienten als 1% aufweisen, bei obiger minimaler Tageshelligkeit eine geringere als die minimal noch zulässige (= 20 Meterkerzen) Lichtintensität haben.

Aus dem Angeführten ergibt sich, dafs man im Sinne meiner Methode — der relativen Photometrie — das hygienische Erfordernis in bezug auf die Taglichtbeleuchtung eines Arbeitsplatzes einfach in der Weise formulieren kann, dafs ein Arbeitsplatz für gewöhnliche Schularbeit bei nebligem dunklem Wetter, bei gleichmäfsig diffus leuchtendem Himmelsgewölbe wenigstens 1% der im Zenit am Himmelsgewölbe gleichzeitig abgelesenen Lichtintensität aufweisen mufs.

Die Frage aber, innerhalb welcher Grenzen sich die Lichtintensität des gleichmäfsig bedeckten Himmelsgewölbes im ungünstigsten Jahresteile während der Unterrichtsstunden bewegt, ist noch nicht systematisch bearbeitet worden.

Ich mufste also selber solche systematische Messungen ausführen, deren Resultate für den verlaufenen Winter im folgenden mitgeteilt werden.

Die Messungen habe ich am 24. November 1904 angefangen und mit einer kleinen Unterbrechung kontinuierlich bis Ende Jänner 1905 fortgeführt. Und zwar wurde die Lichtintensität des Himmelsgewölbes im Zenit mittels eines Weberschen Photometers abgelesen. Der Apparat war unter einem Dachfenster des Dachbodenraumes im Institute, gegen das Himmelsgewölbe gerichtet, dauernd aufmontiert. Zur Ablesung wurde das Fenster immer geöffnet. Die Lampe des Apparates war gründlich von Vorhängen umgeben, um Störungen der richtigen Lage der Benzinflamme durch Luftströmungen zu vermeiden.

Die Ablesung wurde immer um 9 Uhr vormittags und um 3 Uhr nachmittags vorgenommen. Diese Ablesungszeitpunkte sind aus folgenden Gründen ausgewählt worden: Es ist nicht nötig, zu verlangen, dafs die Lichtintensität während der ganzen Unterrichtsdauer des Tages — von 8 Uhr früh bis 4 Uhr nachmittags — der oben angeführten hygienischen Anforderung entspräche. Denn es ist möglich für den ungünstigsten Jahresteil auf die erste und letzte Stunde solche Lektionen zu verlegen, welche kein Lesen, Schreiben und ähnliche die Augen besonders anstrengende Arbeiten erfordern.

Es genügt also, wenn die Beleuchtung von 9 Uhr vormittags bis 3 Uhr nachmittags den Anforderungen entspricht. [1]) Eventuell mufs man sich in der ersten bezw. letzten Stunden durch künstliche Beleuchtung aushelfen.

Anfangs habe ich die Messungen nur bei gleichmäfsiger oder wenigstens annähernd gleichmäfsiger Bedeckung des Himmels ausgeführt (Ergebnisse in der Tabelle durch fettgedruckte Zahlen ausgedrückt), später aber vergleichshalber auch bei ungleichmäfsiger Bedeckung.

---

1) Natürlich kommen — ausnahmsweise — auch nach 9 Uhr, bzw. vor 3 Uhr niedrigere Intensitäten vor als die zu diesen Zeitpunkten gemessenen.

Die Lichtintensität des Himmelsgewölbes im Zenit (in Meterkerzen).

Datum	um 9 Uhr vorm.	Bedeckung des Himmels	um 3 Uhr nachm.	Bedeckung des Himmels
November				
24.	5446		1209	
25.	8916		—	unbedeckt
26.		} unbedeckt		} unbedeckt
27.				
28.	4707		—	unbedeckt
29.	7554		5768	
30.	8566		8512	
Dezember				
1.	1879		1240	
2.	1143		2448	
3.	1360		1106	
4.	1183		—	
5.	—	ungleichmäfsig bedeckt	—	}
6.	3896		—	ungleichmäfsig bedeckt
7.	2126		—	
8.	3359		2448	
9.	2706		—	} ungleichmäfsig bedeckt
10.	4120		—	
11.	1824		1620	
12.	3896		2158	
13.	5643		1850	
14.	2204		30[1]	
15.	1156		—	ungleichmäfsig bedeckt
16.	—	ungleichmäfsig bedeckt	2022	
17.	1277		1839	
18.	1824		1630	
19.	—	ungleichmäfsig bedeckt	—	ungleichmäfsig bedeckt
20.	3896		527	
21.	3560	etwas ungleichmäfsiger bedeckt	4572	etwas ungleichmäfsiger bedeckt
22.	2278	blauer Himmel, wenige Wolken	1214	blauer Himmel
23	1680	dito	2926	
24.	3776	ungleichmäfsig bedeckt	4572	ungleichmäfsig bedeckt

25. Dezember bis 3. Januar wegen Krankheit nicht gemessen.

1) Von 10 Uhr angefangen ein ganz aufsergewöhnlich dunkler Tag (um 11 Uhr vormittags 153 Meterkerzen).

Datum	um 9 Uhr vorm.	Bedeckung des Himmels	um 3 Uhr nachm.	Bedeckung des Himmels
Januar				
4.	3006		4282	
5.	4147		2572	
6.	3896	ziemlich ungleichmäſsig bedeckt	3520	
7.	2572		4572	
8.	—		—	
9.	2390	blauer Himmel	2448	blauer Himmel
10.	2777	ungleichmäſsig bedeckt	—	
11.	3359		4282	} ungleichmäſsig bedeckt
12.	6477		4572	} ungleichmäſsig bedeckt
13.	2448		5353	} ungleichmäſsig bedeckt
14.	3779	ungleichmäſsig bedeckt	3359	klar, bläulicher Himmel
15.	—		—	
16.	3175		4282	
17.	2448		4019	
18.	4572	} ungleichmäſsig bedeckt	5643	ungleichmäſsig bedeckt
19.	4959	} ungleichmäſsig bedeckt	2777	blauer Himmel
20.	2448	bläulicher Himmel	4572	bläulicher Himmel
21.	4282	ungleichmäſsig bedeckt	2777	blauer Himmel
22.	—		—	
23.	2638	bläulicher Himmel	—	
24.	3175		4572	blauer Himmel
25.	8257		5956	
26.	4572	ungleichmäſsig bedeckt	3667	ungleichmäſsig bedeckt
27.	4572	dito	4572	dito
28.	1898		1898	
29.	2159		2159	
30.	2159		2088	
31.	3896		7512	
Februar				
1.	6478			

Die Tabelle zeigt, daſs — mit Ausnahme des ungünstigsten Monates: Dezember — die Intensität des Himmelsgewölbes im Zenit zwischen der 9. Stunde vormittags und der 3. Stunde nachmittags sich fast ausnahmslos oberhalb des Wertes von 1500 Meterkerzen erhält, ja sogar fast ohne Ausnahme oberhalb des Wertes

von 2000 Meterkerzen: Unter 56 Messungen ergaben nur 3 (5,4%) Fälle Intensitäten unterhalb 2000 und von diesen dreien nur ein Fall (1,8%) eine Intensität unterhalb 1500 Meterkerzen.

Im Dezember ergaben die Messungen viel ungünstigere Resultate: Unter 39 Messungen wiesen ganze 19 (= 48,7%) eine niedrigere Intensität als 2000 Meterkerzen, von diesen 19 sogar 11 (28,2%) Fälle weniger als 1500, und von diesen noch 3 (7,4%) weniger als 1000 Meterkerzen.

Kehren wir jetzt zu der vorläufig vorher gemachten Annahme, dafs wir im Sinne meiner Lichtmessungsmethode als das Minimum der Taglichtintensität an einem Arbeitsplatze 1% der im Zenit des Himmelsgewölbes abgelesenen Intensität bezeichnen würden. Wie gestaltete sich die Taglichtbeleuchtung eines solchen Arbeitsplatzes im Verlaufe der verflossenen Winterperiode?

Im Dezember herrschte unter 39 Fällen 19 mal an diesem Platze um 9 Uhr vormittags bzw. um 3 Uhr nachmittags eine geringere Intensität als die minimal zugelassenen 20 Meterkerzen; sogar 11 mal eine geringere als 15, ja 3 mal eine geringere als 10 Meterkerzen.

Es ist klar, dafs uns auch die Minimalanforderung 1% für diese ungünstigste Jahreszeit nicht vor einer bedeutenden Anzahl von Fällen schützt, in welchen zwischen 9 Uhr vormittags und 3 Uhr nachmittags an den am schwächsten beleuchteten Arbeitsplätzen die Belichtungsintensität selbst bedeutend unter das zugelassene Minimum sinken würde.

Natürlich genügt es in solchen Fällen, einfach, die künstliche Beleuchtung anzuwenden. Das kostet natürlich Geld, und es ist einfach Sache des Kalküls, bis wieweit es vorteilhafter ist, die ungenügende Taglichtbeleuchtung der Schulzimmer mittels künstlicher Beleuchtung zu ersetzen, und wieweit man wieder besser auf seine Rechnung kommt durch Erreichung eines reichlicheren Taglichtzutrittes mittels erhöhten Bauaufwandes inklusive der Grundstückbeschaffung, wodurch man einen höheren Minimalquotienten für die Taglichtbeleuchtung der dunkelsten Arbeits-

plätze als 1 % erreichen kann.[1]) Vom rein hygienischen Standpunkte mufs man natürlich immer dem Taglicht Vorzug geben.

Auf Grundlage obiger Messungen nehme ich vorläufig[2]) als »minimale Tageshelligkeit« 2000 Meterkerzen (im Zenit des Himmelsgewölbes gemessen) an.

Was die Frage betrifft, auf welche Art es möglich ist zu ermitteln, wieviel Prozente von der Intensität des Himmelsgewölbes die an einem bestimmten Arbeitsplatze herrschende Intensität beträgt, soll folgendes angeführt werden:

1. Bei einem fertigen Gebäude kann man die von mir in meiner oben zitierten Arbeit angegebene Methode benutzen. (Gleichzeitige Ablesung der Lichtintensität am Himmelsgewölbe und am betreffenden Arbeitsplatze.)
2. Wenn erst nur die Pläne eines zu bauenden Gebäudes vorliegen, so ist der folgende Weg möglich:

Es wird ein teilweises Modell des Gebäudes angefertigt, an welchem alle den Zutritt des Taglichtes beschränkenden Wände, Dächer usw. genau ausgeführt wären (dabei sind die ungünstigsten durch die Bauordnung zugelassenen Verhältnisse und nicht die gerade vorhandenen zu berücksichtigen.) Im Modell des Gebäudes werden nur die Parterreklassen ausgeführt und in diesen wieder nur die dunkelsten Arbeitsplätze; denn es genügt, die ungünstigsten Plätze zu berücksichtigen: wenn diese den Anforderungen entsprechen, entsprechen desto besser die günstigeren. Auf der oberen Fläche der Decke des eben auszumessenden Raumes wird ein Apparat aufgestellt, welcher durch einen Spiegel das Bild des Zenitteils des Himmelsgewölbes[3]) in das Auge des

1) Bei der Erhöhung der Minimalforderung auf 1,5 % würden von jenen 39 Fällen nur in 10 die dunkelsten Plätze eine geringere Intensität als 20, davon nur 3 eine geringere Intensität als 15 Meterkerzen aufweisen.

2) Der definitive Wert soll erst auf Grundlage eines gröfseren Materiales gewählt werden.

3) Die Messung mufs auf einem freien Platze unter freiem Himmel ausgeführt werden.

Beobachters reflektiert; ein zweiter Spiegel reflektiert ebenso das Bild eines weifsen Papierstückchens, welches auf dem zu messenden Arbeitsplatze liegt (oberhalb des Arbeitsplatzes mufs zu diesem Zwecke in der Decke eine kleine Öffnung hergestellt sein). Dieses zweite Bild erscheint dem Auge des Beobachters als ein Fleck auf dem Bilde des Himmelsgewölbes. Mittels eines kalibrierten Rauchglaskeiles wird das letztere Bild soweit verdunkelt, bis es infolge kongruenter Intensität mit dem Bilde des Arbeitsplatzes eben genau verschwimmt.

Auf der Skala wird dann direkt abgelesen — nach der Einstellung des Keiles — wieviel Prozent von der Intensität des Himmelsgewölbes diejenige des betreffenden Arbeitsplatzes beträgt.

Die ziemlich schwierige Konstruktion dieses Apparates bildet den Gegenstand meiner weiteren Arbeit.

Wasserstoffsuperoxyd als Reinigungs- und Desinfektionsmittel im Friseurgewerbe.

Von

Dr. R. Hilgermann.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin. Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Rubner.)

Bei der Fürsorge zur Verhütung der Übertragung ansteckender Krankheiten in den öffentlichen Gewerben hat sich in dem letzten Dezennium die Aufmerksamkeit der Gesundheitsbehörden auch besonders auf das Friseurgewerbe erstreckt, seitdem wiederholt darauf hingewiesen wurde, wieviel ansteckende Krankheiten in ihrer Entstehung und Weiterverbreitung diesem Gewerbe zuzuschreiben seien. Eine gröfsere Anzahl von Städten hat dementsprechende Polizeiverordnungen erhalten, welche den Friseuren strengste Reinlichkeit und sauberste Reinigung, vor allem Desinfektion der dabei in Betracht kommenden Gerätschaften vorschreiben. Seitdem die Walze und zumeist der Rasierpinsel in Wegfall gekommen, für das Messer Reinigungsmittel zur Genüge verwendbar waren, fehlte noch stets für die Bürste, der Hauptträgerin vieler Keime, ein genügendes Desinfektionsmittel. Die vorhandenen und erprobten Verfahren der Desinfektion mittels Formalin, Alkohol usf. waren teils zu teuer, teils zu zeitraubend, teils schädigten sie das Bürstenmaterial. Da man die Unmöglichkeit einer genügenden und billigen Desinfektion einsah, wurden zahl-

reiche Auswege vorgeschlagen. Jeder Kunde z. B. sollte sein eigenes Friseurbesteck haben, oder für besonders desinfizierte Bürsten sollte ein kleiner Kostenaufschlag erhoben werden. Ersterer Vorschlag ist wohl für die sogenannte Stammkundschaft anwendbar, wie verhält es sich aber mit den Fremden und mit denjenigen, die infolge ihres Berufes gezwungen sind, täglich ihren Wohnort zu wechseln? Der zweite Vorschlag — betreffend den Kostenaufschlag für stets vorrätig zu haltende desinfizierte Bürsten — dürfte gerade durch die wenn auch geringe Verteuerung die meisten vor dem Gebrauch einer derartigen Bürste abschrecken. Und doch mufs Publikum wie Gesundheitsbehörde strengste Sauberkeit und Gefahrlosigkeit verlangen können, anderseits ist auch den Friseuren billigerweise nicht zuzumuten, durch Anschaffung kostspieliger Mittel ihren Verdienst sich schmälern zu lassen.

Bei Beurteilung dieser Verhältnisse und der diesbezüglichen vielfachen Neuerungsvorschläge schien es angebracht, vor allem einmal zu untersuchen, was für Reinigungsmittel der Friseur selbst verwendet, um den an die Sauberkeit seiner Gerätschaften gestellten Anforderungen gerecht zu werden. Mufste doch die Beantwortung dieser Fragen im positiven oder negativen Sinne auch für die weitere Benutzung derartiger Mittel von ausschlaggebender Bedeutung sein. Ergaben sich nämlich bei einer Prüfung der Leistungsfähigkeit der zurzeit im Friseurgewerbe üblichen Reinigungsmethoden befriedigende Resultate, so fiel damit auch jeder Grund, die Friseure zum Gebrauch neuer Reinigungsmittel anzuhalten, fort, und würde eine genaue Festsetzung der Anwendungsweise der einzelnen Mittel genügt haben, um einen befriedigenden Ausweg zu sichern.

Im entgegengesetzten Falle mufste gerade von seiten der Gesundheitsbehörde die Anwendung von Reinigungsmethoden untersagt werden, die nutzlos, höchstens geeignet sind, eine noch gröfsere Verschmutzung und Infektionsgefahr herbeizuführen. In bezug auf letzteren Gesichtspunkt war Herr Regierungsmedizinalrat Nesemann so gütig, mir die am meisten in Frage kommenden Reinigungsverfahren zugänglich zu machen.

Die zurzeit gebräuchlichsten Methoden bestehen teils in einer trockenen Reinigung, teils in einer Waschung der Bürsten. Von ersterer Art wird besonders das Ausklopfen mit Mehl bevorzugt, von letzterer das Auswaschen in Soda- und Salmiakgeistlösungen.

Bei einer Nachprüfung dieser Methoden ergab sich, dafs sie wohl eine leidliche, dem Auge sichtbare Reinigung der Bürsten zu erzielen imstande sind, doch ist die hierbei erfolgte etwaige Keimverminderung eine viel zu geringe, als dafs sie den vom hygienischen Standpunkte aus zu stellenden Anforderungen hätte entsprechen können.

Noch einen anderen, nicht zu gering einzuschätzenden Nachteil haben diese Reinigungsarten insofern, als sie sämtlich ziemlich zeitraubend und umständlich sind, denn nur bei einer leicht zu handhabenden und schnellen Methode wird sich der Friseur zu einer öfteren Reinigung seiner Bürsten verstehen wollen.

Eine wirklich befriedigende Lösung dürfte erst dann zu erwarten sein, sobald dem Friseur ein Mittel zur Verfügung steht, das für ihn nicht nur als Desinfektions-, sondern auch als Reinigungsmittel brauchbar, gleichzeitig billig, völlig geruchlos, ungiftig ist und die Bürsten nicht schädigt, dabei darf das Verfahren nicht umständlich und zeitraubend sein.

Auf Anregung von Herrn Geheimrat Rubner habe ich diesbezügliche weitere Untersuchungen gemacht und glaube nunmehr in dem Wasserstoffsuperoxyd ein all diesen Anforderungen genügendes Mittel gefunden zu haben.

Verwendung fand das sog. 10proz. Wasserstoffsuperoxyd (Marke Schering), das in 100 Gewichtsteilen 3 Gewichtsteile H_2O_2 enthält. Auch machte ich Versuche mit dem neuerdings von Merck in den Handel gebrachten 30proz. Perhydrol. Letzteres wirkte natürlich bedeutend prompter, doch kann dasselbe seines hohen Preises wegen kaum in Betracht kommen. Da es sich aber bei diesen Versuchen um eine allen zugängliche Verwertung handeln sollte, bezog ich sodann aus den verschiedensten Geschäften das nötige Wasserstoffsuperoxyd, um gleichzeitig die

Möglichkeit einer allgemeinen Anwendung in ihren Erfolgen kontrollieren zu können.

Als Versuchsmaterial diente mir aufser einer grofsen Anzahl in Gebrauch befindlicher Friseurbürsten noch Bürsten, die ich mit Staphylokokkenkulturen, einmal auch mit Trichophyton und Favus verunreinigte. Diese Verunreinigungsversuche führte ich in der Weise aus, dafs ich die Bürsten mit 2—3 24 Stunden alten Staphylokokkenbouillon-Kulturen übergofs und sodann durch mehrere Stunden im Brutschrank bei 37° trocknete.

Die zu reinigenden Bürsten wurden zusammen mit einem im Gebrauch befindlichen Kamme für wechselnde Zeiten in verschieden starken Lösungen in Standgefäfse gestellt, einige Male gründlichst durchgekämmt und sorgfältig mit sterilem Wasser durchspült.

Sowohl vor als nach der Behandlung der Bürsten mit H_2O_2 wurden stets ca. fünf Borsten aus den verschiedensten Stellen der Bürsten mit steriler Pinzette herausgezogen, auf sterile Petrischalen gelegt und teils mit Gelatine, teils mit Agar übergossen, oder die Borsten wurden in sterile Bouillon gebracht, um auf diese Weise die besten Wachstumsbedingungen für vorhandene Keime zu ermöglichen. Gleichzeitig wurden stets Kontrollplatten angelegt.

Nach zahlreichen Vorversuchen bin ich zu dem Resultat gekommen, dafs für die Zwecke des Friseurgewerbes am geeignetsten eine 5 proz. Lösung ist, d. h. die im Handel erhältliche Stammlösung ist zur Hälfte mit Wasser zu verdünnen. In dieser verbleiben die Bürsten 30 Minuten und werden sodann mit dem betreffenden Kamm ausgebürstet. Bei diesem Verfahren blieben stets die nach der Reinigung angelegten Platten steril oder zeigten höchstens ausnahmsweise vereinzelte Kolonien, während die Platten vor der Reinigung massenhaft Kolonien aufwiesen. Am besten sind die Bürsten in Standgefäfse zu stellen, eventuell gewöhnliche Wassergläser, während Schalen nicht zu empfehlen sind.

Aufser den Bürsten werden auf diese Weise gleichzeitig die Kämme gereinigt.

Folgende Tabelle zeigt die Endergebnisse:

Versuch I.

Untersuchungsmaterial: 5 in täglichem Gebrauch befindliche Friseurbürsten.

Nummer der Bürste	Konzentration der zur Reinigung verwandten H_2O_2-Lösung	Einwirkungszeit	Nährboden	Bürste vor der Behandlung mit H_2O_2	Desinfektionserfolg nach der Behandlung der Bürste mit H_2O_2
1.					Steril
2.					»
3.	5 proz.	30 Min.	Agar, Gelatine, Bouillon	Auf den Platten zahlreichste Kolonienbildung, sowohl entlang den Borsten, als auch im freien Gesichtsfeld. Bouillon stark getrübt.	»
4.					»
5.					»

Versuch II.

Infektionsmaterial: Staphylokokken.

Nummer der Bürste	Konzentration der zur Reinigung verwandten H_2O_2-Lösung	Einwirkungszeit	Nährboden	Bürste vor der Behandlung mit H_2O_2	Desinfektionserfolg nach der Behandlung der Bürste mit H_2O_2
1.					Steril
2.					»
3.	5 proz.	30 Min.	Agar, Gelatine, Bouillon	Auf den Platten reichlichste Staphylokokken-Kolonien. Bouillon stark getrübt.	»
4.					»
5.					»

Bei Versuch I und II wurde jede Bürste für sich in einer stets neu hergestellten Lösung gereinigt, bei dem folgenden Versuch III hingegen dieselbe Lösung zur Reinigung von drei verschiedenen Bürsten benutzt. Das bei diesem Versuch erzielte Ergebnis zeigt für die Verwendung im Friseurgewerbe, also für die allgemeine Praxis, dafs in derselben Lösung ohne Beeinträchtigung des Resultats 2—3 Bürsten gereinigt werden können. Bedenkt man aber, dafs es sich bei meinen Versuchen stets um arg ver-

nachlässigte oder absichtlich mit Infektionsmaterial imprägnierte Bürsten handelte, so würde sich bei steter Anwendung des Mittels und dementsprechender zunehmender Sauberkeit die Leistungsfähigkeit derselben Lösung noch erheblich steigern lassen und hiermit die Auslagen stetig billigere werden.

Versuch III.

Untersuchungsmaterial: 3 in täglichem Gebrauch befindliche Haarbürsten.

Nummer der Bürste	Konzentration der zur Reinigung verwandten Lösung	Einwirkungszeit	Nährboden	Vor der Behandlung mit H_2O_2	Desinfektionserfolg nach der Behandlung mit H_2O_2
1.	5 proz.	30 Min.	Agar, Gelatine, Bouillon	135 K.	Steril
2.				90 »	»
3.				105 »	1 K.

Haben die in vorstehender Tabelle angeführten Versuchsreihen bewiesen, daſs bei dieser Art der Reinigung eine gute desinfizierende Wirkung erzielt wird, so ergibt Versuch IV, daſs die bei meinen Versuchen verwandte Wasserstoffsuperoxydlösung vor allem auch eine prophylaktische Wirkung auszuüben imstande ist. Mit diesem Nachweis der Prophylaxis ist aber in der Verhütung der Weiterverbreitung ansteckender Krankheiten in den öffentlichen Gewerben ein weiterer Schritt getan.

Versuch IV.

Untersuchungsmaterial: 3 mit H_2O_2 vorbehandelte Bürsten.
Infektionsmaterial: Staphylokokken.

Nummer der Bürste	Konzentration der zur Reinigung verwandten Lösung	Einwirkungszeit	Nährboden	Vor der Behandlung mit H_2O_2, nach der Infektion mit Staphylokokken	Nach der Behandlung mit H_2O_2 (Desinfektionserfolg	Kontrollröhrchen u. Platte
1.	5 proz.	30 Min.	Agar, Gelatine, Bouillon	Steril	Steril	+
2.				»	»	+
3.				»	»	+

Um die Desinfektionswirkung der bei obigen Versuchen benutzten Wasserstoffsuperoxydlösung noch eingehender festzustellen und zu prüfen, machte ich einen Kontrollversuch mit Milzbrandsporenseidenfäden. Es zeigte sich hierbei, dafs die 5proz. Lösung auch zur Abtötung dieser resistenten Sporen in verhältnismäfsig kurzer Zeit ausreichend ist. Seidenfäden, die die zur Abtötung der Milzbrandsporen drei Minuten strömendem Wasserdampf und 24 Stunden Sublimatlösung (1 : 1000) ausgesetzt werden mufsten, waren nach 50 Minuten langem Verweilen in der Wasserstoffsuperoxydlösung abgetötet.

Wenn auch die im vorhergehenden mitgeteilten Resultate die Möglichkeit einer vollkommenen Sterilisierung der als Versuchsmaterial benutzten Friseurbürsten erwiesen haben, so mufs doch das Wasserstoffsuperoxyd noch andere Eigenschaften besitzen, die den Vorschlag einer eventuellen Einführung desselben in die Hygiene der Friseurstuben nicht nur als wünschenswert, sondern vor allem auch als berechtigt erscheinen lassen. Bei meinen Versuchen bin ich nun zu dem Resultat gekommen, dafs neben der Keimabtötung vor allem auch gleichzeitig eine gute Reinigung, selbst der verschmutztesten Bürsten, erzielt wird, welch letzteres mir auch von Fachleuten bestätigt wurde. Bürsten, welche vor der Reinigung mit Wasserstoffsuperoxyd eine dichte, verfilzte Schmutzschicht auf dem Bürstenboden und entlang den Bürstenbündeln zeigten, waren nach der Reinigung vollständig von diesen gesäubert.

Mit dem Moment der gleichzeitigen Reinigung und Desinfektion in kürzester Zeit fällt aber jeder Einwand der Friseure von einer unnötigen Überlastung oder Inanspruchnahme in sich zusammen, und kann sodann ein Zwang von seiten der Gesundheitsbehörde nicht mehr als unbillige Forderung angesehen werden. Da ferner, wie ich oben beschrieben, die Reinigung nur Bruchteile von Minuten dauert, würde dieses Verfahren vielleicht schon an und für sich allmählich die Indolenz der Friseure überwinden können. Dazu kommt, dafs das Wasserstoffsuperoxyd sehr billig, völlig geruchlos ist und desodorierend

wirkt. Wie bei Versuch III (vgl. Tabelle) angegeben, ist dieselbe Lösung für mehrere Bürsten verwendbar, auch ist sie noch nach mehreren Tagen völlig brauchbar. Das Bürstenmaterial, der Holzboden, Lack oder die Festigkeit der einzelnen Borstenbündel hat, abgesehen von ganz minderwertigem Material, niemals eine Schädigung oder eine Verminderung der Leistungsfähigkeit gezeigt. Die Dehnbarkeit und Reifsbelastung[1]) der Borsten habe ich sowohl vor als nach Anwendung des Wasserstoffsuperoxyds mit dem Präzisionsapparat geprüft und keinerlei Veränderung gefunden. Zu erwähnen wäre, dafs allerdings Bürsten mit gelblichweifsen Borsten eine allmähliche Bleichung erlitten, jedoch dürfte dieses in der Praxis der Friseurstuben eher als Vorteil denn als Nachteil gelten.

Infolgedessen müfste bei seinen vielen einwandsfreien Vorzügen das Wasserstoffsuperoxyd sich wohl eignen, die Kalamität der Friseurstuben in bezug auf Mangel an Reinlichkeit und Ansteckungsgefahren zu beseitigen. Eine dementsprechende Verordnung könnte die Friseure dazu anhalten, täglich zwei- bis dreimal die im Gebrauch befindlichen Bürsten und Kämme einige Zeit in die in einem gläsernen Standgefäfs oder Wasserglas bereitstehende Lösung zu stellen, oder sie wenigstens bei Schlufs des Geschäftes oder mindestens alle zwei bis drei Tage nach den oben angegebenen Vorschriften gründlich zu säubern. Eine Kontrolle wäre jederzeit leicht möglich.

Nicht blofs für das Friseurgewerbe, sondern auch für Krankenhäuser, Anstalten und gröfsere Betriebe wäre dieser Modus der Reinigung wohl ein willkommener Ausweg. Denn nunmehr würden stets vollständig saubere und sterile Bürsten zur Verfügung stehen, gröfsere Anschaffungsausgaben und Übertragungsgefahren aber in Wegfall kommen.

---

1) Weitere Untersuchungen zu dem in § 2,1 der Bekanntmachung des Herrn Reichskanzlers vom 28. Januar 1899 für Rofshaarspinnereien usw. vorgeschriebenen Desinfektionsverfahren mittelst Wasserdampf. Arbeiten aus dem Kais. Gesundheitsamt 1901, von Dr. P. Musehold, Oberstabsarzt.

Herrn Regierungsrat Dr. Weber vom Kais. Gesundheitsamt für die gütige Erlaubnis der Benutzung des Präzisionsapparates ergebenster Dank.

Herrn Geheimen Medizinalrat Dr. Rubner spreche ich für die gütige Anregung, Herrn Professor Dr. Ficker für seine Unterstützung bei Abfassung der Arbeit meinen ganz ergebensten Dank aus. Herrn Regierungsmedizinalrat Dr. Nesemann und Herrn Geheimen Medizinalrat Dr. Granier bin ich für die gütige Unterstützung bei Beschaffung des erforderlichen Materials zu Dank verpflichtet.

Literatur.

Bruhns, Handbuch d. Hygiene von Dr. Th. Weyl. II. Supplementband, 1902.

Strafsmann, Hygienische Rundschau, 1903, Nr. 5.

Berger, Zentralblatt f. Bakteriologie, 1898, Bd. 23.

Lichtenstein, Deutsche med. Wochenschrift, 1900, Nr. 10.

Blaschko, Berl. kl. Wochenschrift, 1893, Nr. 35.

Kausch, Zentralblatt f. Bakteriologie, 1902, Bd. 31.

Weichselbaum, Münchener med. Wochenschrift, 1898, Nr. 8.

Musehold, Arbeiten aus dem Reichsgesundheitsamt, 1901.

Kolle-Wassermann, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, 1903, S. 31.

Fluegge, Grundrifs der Hygiene, 1897, S. 46.

Behring, Bekämpfung der Infektionskrankheiten, 1894, S. 98.

Therapeutische Monatsberichte, 1905, 2. Heft.

Bemerkungen zur Abhandlung von E. Mettler über die bakterizide Wirkung des Lichtes auf gefärbte Nährböden.

Von

H. v. Tappeiner.

Die Art der Besprechung der mit dieser Abhandlung[1]) in Beziehung stehenden früheren Arbeiten veranlafst mich zu folgenden Bemerkungen:

1. In der Einleitung wird gesagt, dafs diese Untersuchung durch eine Idee von Dreyer, Gewebe durch Zusatz gewisser Stoffe zu sensibilisieren, veranlafst worden sei. Es wird hierbei zu erwähnen unterlassen, dafs sämtliche hierfür grundlegenden Versuche inklusive dem Hinweis auf Sensibilisierung bereits von anderer Seite 1900 veröffentlicht wurden.[2]) Da ich schon einmal genötigt war, gegen diese historisch unrichtige Darstellung Verwahrung einzulegen und dieselbe von verschiedensten Seiten Zustimmung gefunden hat, genügt es, darauf hinzuweisen.
2. In der am Schlusse folgenden Literaturzusammenstellung ist die von mir gemeinsam mit Jodlbauer ausgeführte Untersuchung über die Wirkung photodynamischer (fluoreszieren-

1) Archiv f. Hygiene, Bd. 53, S. 79.

2) H. v. Tappeiner, Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab, Münchener med. Wochenschrift, 1900, Nr. 1.

3) H. v. Tappeiner, Zur Kenntnis der lichtwirkenden (fluoreszierenden) Stoffe. Deutsche med. Wochenschrift, 1904, Nr. 16.

der) Stoffe auf Protozoen und Enzyme[1]) zwar zitiert, im übrigen aber unberücksichtigt geblieben. Nur so ist es zu erklären, dafs Ansichten und Behauptungen aufs neue vorgebracht werden, welche dort experimentell widerlegt wurden und fundamentell irrige Sätze Aufnahme finden konnten, wie der folgende: »Das Erythrosin unterscheidet sich vom Eosin durch das Fehlen der Fluoreszenz.«

3. Die Darstellung der Beziehungen der photodynamischen Erscheinung zu Fluoreszenz und Sensibilisierung scheint mir der wirklichen Sachlage nicht zu entsprechen. Da ähnliche Auffassung auch bei einzelnen anderen Bearbeitern dieses Gebietes sich findet, dürfte es angezeigt sein, den gegenwärtigen Stand der Frage, soweit sie Bakterien betrifft, in Kürze zu präzisieren.

Die Frage, ob die photodynamische Erscheinung und die von H. W. Vogel an Bromsilberplatten entdeckte optische Sensibilisierung identische Vorgänge sind, wurde durch die von Jodlbauer und mir angestellten Versuche insoferne verneinend beantwortet, als erstere nach den bisherigen Erfahrungen nur durch Stoffe bewirkt wird, welche die Eigenschaft haben in wässeriger Lösung zu fluoreszieren, letztere hingegen auch durch Stoffe erfolgt, welchen diese Fähigkeit abgeht.

Unentschieden hingegen ist die weitere Frage, ob die photodynamische Erscheinung als Sensibilisierung aufzufassen ist, wenn man darunter ganz allgemein die Steigerung jedes Prozesses versteht, der auch durch Licht allein verursacht wird.

Nun wurde durch unsere Untersuchungen[2]) ermittelt, dafs Bacillus prodigiosus, Proteus vulgaris und Bact. acidi lactici durch verschiedene fluoreszierende Stoffe (Eosin, Erythrosin, Rose bengale, Phenosaframin, Methylenblau) bei Gegenwart von zerstreutem Tageslichte zu einer Zeit (je nach der angewandten Substanz 1—7 Tage) abgetötet werden, in der von einer Wirkung des Lichtes allein

1) D. Arch. f. klin. Medizin, Bd. 80, S. 427—487.

2) A. Jodlbauer u. H. v. Tappeiner, Über die Wirkung photodynamischer (fluoreszierender) Stoffe auf Bakterien. Münchener med. Wochenschrift, 1904, Nr. 25.

noch nichts zu bemerken ist. Anderseits steht fest, dafs Licht allein, insbesondere ultraviolettes Licht, Bakterien zu töten vermag, wenn es sehr intensiv ist. Daraus wird von mehreren Autoren der Schlufs gezogen, dafs es sich bei der Wirkung der fluoreszierenden (photodynamischen) Stoffe um eine Steigerung der einfachen Lichtwirkung handle und somit die Auffassung des Vorganges als Sensibilisation bewiesen sei. Ich halte diesen Schlufs nach dem gegenwärtigen Stande der Untersuchungen noch nicht für berechtigt. Es wird dabei aufser acht gelassen, dafs Tötung von Bakterien auf verschiedene Weise bewirkt werden kann. Zwei Vorgänge, die zu demselben Endeffekt führen, dürfen nicht ohne weiteres als identisch betrachtet werden. Die Berechtigung hierzu ist erst mit dem Nachweise gegeben, dafs dieser Endeffekt, also die Tötung der Bakterien, in beiden Fällen unter denselben Bedingungen erfolgt. Nun ist als notwendige Bedingung der Abtötung von Bakterien durch fluoreszierende Stoffe die Anwesenheit von Sauerstoff erkannt.[1]) Die Frage hingegen, ob diese Bedingung auch für die Abtötung der Bakterien durch Licht allein Geltung hat, ist trotz vieler Untersuchungen noch unentschieden. Der letzte Bearbeiter[2]) derselben verneint dieselbe geradezu; der erste Satz im Resümmee des Resultates seiner Versuche hat folgenden Wortlaut: »Die bakterizide Wirkung des Lichtes ist nicht in dem Sinne ein Oxydationsprozefs, dafs das Vorhandensein des Sauerstoffs eine Bedingung für dieselbe ist. Das Licht vermag nämlich Bakterien zu töten, selbst wenn jede Spur von Sauerstoff fehlt, und wenn sich während der Belichtung kein neuer Sauerstoff durch Dekomposition chemischer Stoffe bilden kann.«

Es unterliegt daher keinem Zweifel, dafs es bei diesem gegenwärtigen Stande der Untersuchung nicht zulässig ist, von der Auffassung der photodynamischen Erscheinung als Sensibilisierung

---

1) A. Jodlbauer u. H. v. Tappeiner, Die Beteiligung des Sauerstoffs bei der Wirkung fluoreszierender Stoffe. D. Arch. f. klin. Medizin, Bd. 82, S. 520.

2) V. Bie, Ist die bakterizide Wirkung des Lichtes ein Oxydationsprozefs. Finsens med. Lichtinstitut, 1905, Heft 9, S. 73.

wie von einer erwiesenen Tatsache zu sprechen, und ich glaube, es war durchaus gerechtfertigt, die im Münchener Pharmakologischen Institute entdeckte Lichtwirkung bis zur Klärung ihrer Beziehungen zu Fluoreszenz und Sensibilisation mit dem nichts präjudizierenden Namen photodynamische Wirkung zu belegen.

Wie bereits erwähnt, gelten diese Bemerkungen nur für Bakterien. Für Enzyme dürfte die Frage nach Untersuchungen von Jodlbauer und mir, welche an anderer Stelle ausführlich veröffentlicht werden sollen, entschieden sein. Es sei hier nur eine Versuchsreihe als Beleg angeführt.

Gläserne Gaswaschflaschen, aus einem Stück geblasen, wurden im Dunkelzimmer zu ca. $^1/_3$ mit klarer Invertinlösung gefüllt und der überstehende Luftraum nach sorgfältiger Evakuierung durch Wasserstoff, resp. Sauerstoff, ersetzt. Nach dem Zuschmelzen wurden die Flaschen unter guter Kühlung durch Leitungswasser, bedeckt von einer Glasplatte, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen von $^1/_2$10—5 Uhr dem intensivsten Sonnenlichte (Juli) ausgesetzt. Zur Kontrolle wurde je eine Sauerstoff- resp. Wasserstoffflasche, mit doppelter Stanniollage umhüllt, daneben gelegt. Diese Dunkelflaschen befanden sich also unter denselben Bedingungen, nur der Lichtzutritt war vollständig ausgeschlossen. Aus sämtlichen Röhren wurden hierauf je 5 ccm Fermentlösung entnommen, mit 5 ccm 15proz. Rohrzucker versetzt und die Invertierung nach 4 Stunden mit einem Halbschattenapparate nach Laurent polarimetrisch bestimmt.

	Drehung	Gebildeter Invertzucker, wenn vollständige Invertierung = 100 gesetzt wird
Wasserstoffflasche, dunkel . .	— 0° 45′	86,9 %
Wasserstoffflasche, hell . . .	— 0° 47′	87,3 %
Sauerstoffflasche, dunkel . .	— 0° 48′	87,6 %
Sauerstoffflasche, hell . . .	+ 0° 34′	66,7 %

Der Versuch ergibt folgendes: Das Ferment wurde in Wasserstoffatmosphäre durch Sonnenlicht nicht geschädigt, denn seine invertierende Wirkung ist sogar eine Kleinigkeit gröfser wie in der Dunkelröhre; bei Gegenwart von Sauerstoff hingegen ist die Schädigung unverkennbar, denn die Invertierung blieb um mehr als einen Grad des Polarimeters zurück. Hiermit ist anscheinend einwandfrei der Beweis erbracht, dafs Enzyme durch Licht nur bei Gegenwart von Sauerstoff merkbar geschädigt werden, also unter derselben Bedingung wie bei Anwesenheit von fluoreszierenden Stoffen. Die Wirkung dieser Substanzen besteht daher in einer Steigerung dieser Schädigung und kann als Sensibilisierung im weiteren Sinne des Wortes bezeichnet werden. Die Steigerung ist allerdings eine sehr grofse, denn bei Zusatz von Eosin unter denselben Bedingungen (Sauerstoffgegenwart und durch Glas und Wasser filtriertes Sonnenlicht) war das Invertin nach $^1/_4$ Stunde nicht blofs deutlich geschädigt, sondern fast vollständig (zu $^9/_{10}$) vernichtet

Weitere Versuche mit photodynamischen, sensibilisierenden Farbstoffen. (Eosin, Erythrosin.)

Prüfung der Wirkung des Tageslichtes auf Lebensfähigkeit und Virulenz von Bakterien, auf Toxine und Antitoxine und auf das Labferment.

Von

Dr. **Hans Huber.**

(Aus der bakteriologischen Abteilung des Hygiene-Institutes der Universität Zürich. Vorstand: Privatdozent Dr. W. Silberschmidt.)

In neuerer Zeit hat das Licht in der Medizin immer mehr an Bedeutung gewonnen. Währenddem klinische Arbeiten darüber schon in ziemlich grofser Zahl vorliegen, sind die experimentellen bis jetzt noch ziemlich spärlich.

Mettler (1) hat im hiesigen Institute Versuche über die bakterizide Wirkung des Lichtes auf mit Eosin, Erythrosin und Fluoreszein gefärbten Nährböden vorgenommen. Ich habe diese Versuche fortgesetzt und erweitert; neben der Prüfung der bakteriziden Wirkung verfolgten meine Untersuchungen vor allem den Zweck, den Einflufs des Lichtes auf Virulenz der Bakterien, auf Toxine und Antitoxine und auf das Labferment eingehend zu prüfen.

Erster Abschnitt.

Wirkung des Lichtes auf Lebensfähigkeit und Virulenz pathogener Mikroorganismen.

Wie Mettler in seiner Arbeit näher ausführt, wurde die bakterizide Wirkung des Lichtes schon von einigen Forschern wie Downes und Blunt (2), Dieudonné (3), Finsen (4) und Andern experimentell untersucht. Von den neueren Autoren haben

namentlich Tappeiner (5) und seine Schüler, Dreyer (6) und Bie (7) diese Versuche auf Prüfung der Lichtwirkung bei Zusatz von photodynamischen oder sensibilisierenden Substanzen ausgedehnt. Mettler hat diese Versuche an Choleravibrio, Staphylokokkus pyogenes aureus, Bact. Typhi und Bact. coli weitergeführt und dabei gefunden, dafs Eosin oder Erythrosin, dem Nährboden zugefügt, sowohl die entwicklungshemmende als die bakterientötende Wirkung des Lichtes erhöhen. Auch über die Fähigkeit des Lichtes, die Virulenz der pathogenen Bakterien herabzusetzen, ja selbst aufzuheben, wurden schon zahlreiche Versuche gemacht. Arloing (8) impfte verschieden lange Zeit am Sonnenlicht exponiert gewesene Anthraxkulturen auf Meerschweinchen. Die mit den am längsten belichteten Kulturen geimpften Meerschweinchen blieben am Leben, wenn auch in der Bouillon noch Wachstum der Bakterien vorhanden war.

Duclaux (9), Palermo (10) und Chemelewsky (11) zeigten die Virulenzherabsetzung an verschiedenen Mikrokokken und pyogenen Bakterien, d'Arsonval et Charrin (12) an Bac. pyocyaneus.

Von Momont (13) wurde nachgewiesen, dafs der B. anthracis die durch Exposition an der Sonne eingebüfste Virulenz wieder erhielt, indem die exponiert gewesenen Bakterien in Bouillon weitergezüchtet wurden und sich beim wiederholten Tierexperiment als virulent erwiesen. Die Milzbrandbazillen waren nach 6½ Stunden Belichtung abgetötet.

Von Santori (14) wird behauptet, dafs die Milzbrandbazillen, ehe sie vom Sonnenlicht getötet werden, eine ächte Abschwächung erfahren.

Versuchsanordnung.

Als Lichtquelle wurde bei unseren Versuchen ausschliefslich Sonnenlicht, bzw. das diffuse Tageslicht benutzt. Die Kulturen und Lösungen wurden zu diesem Zwecke auf dem Dache des hygienischen Institutes aufgestellt, das Licht hatte also von allen Seiten freien, ungehinderten Zutritt.

Die meisten Versuche wurden in gewöhnlichen Glasgefäfsen, Reagenzröhrchen und in mit Glasdeckel versehenen Schälchen

ausgeführt. Wir wissen, dafs dadurch ein Teil der wirksamen Strahlen, namentlich die ultravioletten, zurückgehalten werden; es wurden deshalb auch einige vergleichende Untersuchungen mit zugedeckten und offenen Schälchen vorgenommen.

In einigen Versuchen wurde die Exposition in einem Kasten aus Rubinglas und unter doppelwandigen Glasglocken, mit verdünnten Eosin- resp. Erythrosinlösungen und mit Alaunlösung gefüllt, wie Mettler die betreffenden Instrumente in seiner Arbeit näher beschreibt, ausgeführt. Die Versuche hatten den Zweck, die Einwirkung des Lichtes zu studieren, nachdem dasselbe rotes Glas passiert hatte, bzw. durch sensibilisierende Farbstofflösungen unter möglichster Wärmeausschaltung filtriert worden war. Die Versuche wurden ferner zum gröfsten Teil in offenen, der Luft zugänglichen Gefäfsen ausgeführt, daneben wurden aber auch einige vergleichende Experimente im Vakuum, d. h. in zugeschmolzenen Röhren unter Luftabschlufs gemacht, da namentlich die Untersuchungen von Bie (15), wie auch von anderen, die Bedeutung des Sauerstoffzutrittes hervorgehoben haben.

Zur Färbung wurden benutzt Eosin (Tetrabromfluoreszein) und Erythrosin (Tetrajodfluoreszein). Die Färbung wurde durchweg vorgenommen im Verhältnis von 1 : 1000.

1. Wirkung auf Lebensfähigkeit der Bakterien.

Während Mettler seine Versuche fast nur an Gelatine bzw. Agarnährböden vornahm, wurden unsere Versuche mit Bouillonkulturen resp. Aufschwemmungen in Bouillon ausgeführt. Im Gegensatz zu Bie wurde stets mit grofsen Mengen von Mikroorganismen gearbeitet. Wir verwendeten zu unseren Versuchen zwei pathogene Mikroorganismen und zwar wählten wir einen sogenannten infektiösen, den Streptococcus pyogenes und einen toxisch wirkenden, den Diphtheriebazillus. Die verwendete Kultur des Streptococcus pyogenes war durch eine Anzahl von Tierpassagen von Herrn Dr. Simon in ihrer Virulenz bedeutend erhöht worden, so dafs eine Menge von 0,0001 ccm genügte, um eine Maus zu töten. Der Diphtheriebazillus wurde aus einer Serumkultur eines Falles von Diphtherie isoliert.

Es wurden zu jedem Versuche frische Bouillonkulturen einer Streptokokkenreinkultur resp. Blutserumkulturen einer Reinkultur des Diphtheriebazillus verwendet. Die Streptokokkenbouillonkultur wurde direkt im Verhältnis von 1 : 1000 mit Eosin bzw. Erythrosin gefärbt, von der Diphtherieblutserumkultur wurde eine Aufschwemmung in Bouillon gemacht und dieselbe dann auf gleiche Weise gefärbt.

Die Exposition im Freien wurde in kleinen, sterilisierten Doppelschälchen vorgenommen, ebenso wurden Kulturen in Doppelschälchen in schwarzes Papier eingehüllt, unter Lichtabschlufs zu Kontrollversuchen exponiert.

Nach beendeter Exposition wurden drei Tropfen der betreffenden Kultur auf Schrägagar überimpft und die Agarröhrchen im Brutschrank bei 36° C aufbewahrt. Das Wachstum der Agarkulturen wurde sodann mindestens zwei Tage lang beobachtet und nur deutliche Unterschiede notiert.

Für die Intensität des Wachstums wurden bei den folgenden Versuchen nachstehende Bezeichnungen gewählt:

+++ sehr reichliches Wachstum,
++ reichliches Wachstum,
+ geringes Wachstum,
L einzelne Kolonien,
0 kein Wachstum.

I. Versuche am Tageslichte.

1. Versuch mit Streptokokken.

26. I. Streptokokkenbouillon wird ungefärbt, mit Eosin bzw. Erythrosin gefärbt dunkel und am Lichte 1, 3 und 6 Stunden lang exponiert.

Lichtverhältnisse: hell, keine Sonne.

Dauer d. Exposition	1 Stunde		3 Stunden		6 Stunden		Kontroll nicht exponiert	
Wachstum am . .	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag
Bouillon ungefärbt	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Bouillon mit Eosin gefärbt	++	++	0	0	0	0	+++	+++
Bouillon mit Erythrosin gefärbt .	++	++	0	0	0	0	+++	+++

2. Versuch mit Diphtheriebazillen.

27. I. Diphtheriebouillon wird ungefärbt, mit Eosin bzw. Erythrosin gefärbt dunkel und am Lichte 1, 3 und 5 Stunden lang exponiert.

Lichtverhältnisse: Sonne, zeitweise trübe.

Dauer d. Exposition	1 Stunde		3 Stunden		5 Stunden		Kontroll nicht exponiert	
Wachstum am . .	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag
Bouillon ungefärbt	+	++	+	++	0	+	+++	+++
Bouillon mit Eosin gefärbt	+	++	0	L	0	0	+++	+++
Bouillon mit Erythrosin gefärbt .	+	++	0	L	0	0	+++	+++

II. Vergleichende Versuche am Tageslichte und unter dem Rubinglaskasten.

3. Versuch mit Diphtheriebazillen.

2. II. Diphtheriebouillon wird ungefärbt, mit Eosin resp. Erythrosin gefärbt, direkt am Lichte 2, 3 und 4 Stunden lang und unter Rubinglaskasten 6, 12, 18 und 24 Stunden lang exponiert.

Lichtverhältnisse: Sonne, zeitweise trübe.

a) Exposition am Tageslicht.

Dauer d. Exposition	2 Stunden		3 Stunden		4 Stunden		Kontroll	
Wachstum am . .	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag
Bouillon ungefärbt	+	+	L	+	0	+	++	+++
Bouillon mit Eosin gefärbt	0	L	0	L	0	0	++	+++
Bouillon mit Erythrosin gefärbt .	0	0	0	0	0	0	++	+++

b) Exposition unter Rubinglaskasten.

Dauer d. Exposition	6 Std.	12 Std.	18 Std.	24 Std.	Kontroll
Wachstum am . .	1. T.	1. T.	1. T.	1. T.	1. T.
Bouillon ungefärbt	+++	+++	++	++	+++
Bouillon mit Eosin gefärbt	+++	+++	++	++	+++
Bouillon mit Erythrosin gefärbt .	+++	+++	+	L	+++

4. Versuch mit Streptokokken.

3. II. Streptokokkenbouillon wird ungefärbt, mit Eosin resp. Erythrosin gefärbt, direkt am Lichte 2, 4 und 6 Stunden lang und unter Rubinglaskasten 6, 12, 18 und 24 Stunden lang exponiert.

Lichtverhältnisse: Sonne, zeitweise trübe.

a) Exposition am Tageslicht.

Dauer d. Exposition	2 Stunden		4 Stunden		6 Stunden		Kontroll	
Wachstum am . .	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag
Bouillon ungefärbt	+++	+++	+	+++	+	++	+++	+++
Bouillon mit Eosin gefärbt	+	++	0	0	0	0	+++	+++
Bouillon mit Erythrosin gefärbt .	0	L	0	0	0	0	+++	+++

b) Exposition unter Rubinglaskasten.

Dauer d. Exposition	6 Std.	12 Std.	18 Std.	24 Std.	Kontroll
Wachstum am . .	1. T.	1. T.	1. T.	1. T.	1. T
Bouillon ungefärbt	+++	+++	+++	++	+++
Bouillon mit Eosin gefärbt	+++	+++	++	+	+++
Bouillon mit Erythrosin gefärbt .	+++	+++	+	L	+++

III. Vergleichende Versuche bei Luftzutritt und bei Luftabschlufs.

5. Versuch mit Diphtheriebazillen.

4. II. Diphtheriebouillon wird ungefärbt, mit Eosin resp. Erythrosin gefärbt, bei Luftzutritt in Doppelschälchen und bei Luftabschlufs in geschlossenen Glaszylindern nach Absaugen der Luft exponiert, 4 Stunden lang.

Lichtverhältnisse: Sonne.

Wachstum bei	Luftzutritt am		Luftabschlufs am	
	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag
Bouillon ungefärbt . . .	L	+	++	+++
„ mit Eosin gefärbt	0	0	++	+++
„ mit Erythrosin gef.	0	0	++	+++

6. Versuch mit Diphtheriebazillen.

17. II. Diphtheriebouillon wird ungefärbt, mit Eosin resp. Erythrosin gefärbt, unter Luftzutritt in Doppelschälchen und unter Luftabschlufs in zugeschmolzenen Pipetten 4 und 10 Stunden lang exponiert.

Lichtverhältnisse: Sonne, zeitweise trübe.

Dauer der Exposition .	4 Stunden		10 Stunden		Kontroll	
Wachstum am	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag
Bouillon ungefärbt bei Luftzutritt	+	++	L	+	++	+++
Bouillon mit Eosin gefärbt bei Luftzutritt .	L	+	0	L	++	+++
Bouillon mit Erythrosin gefärbt bei Luftzutritt	L	+	0	L	++	+++
Bouillon ungefärbt bei Luftabschlufs . . .	++	++	L	+		
Bouillon mit Eosin gef. bei Luftabschlufs . .	+	++	L	+		
Bouillon mit Erythrosin gef. bei Luftabschlufs	+	+	L	+		

IV. Vergleichende Versuche in offenen und bedeckten Schälchen.

7. Versuch mit Streptokokken.

8. II. Streptokokkenbouillon wird ungefärbt, mit Eosin resp. Erythrosin gefärbt, in offenen und bedeckten Schälchen 4 Stunden lang exponiert.

Lichtverhältnisse: Sonne.

Wachstum in	offenen Schälchen		bedeckten Schälchen	
	1 Tg.	2 Tg.	1 Tg.	2 Tg.
Bouillon ungefärbt . . .	++	++	+++	+++
» mit Eosin gefärbt	0	L	L	+
» mit Erythrosin gefärbt	0	L	L	+

8. Versuch mit Streptokokken.

9. II. Streptokokkenbouillon wird ungefärbt, mit Eosin resp. Erythrosin gefärbt, 3 und 5 Stunden lang in offenen und bedeckten Schälchen exponiert.

Lichtverhältnisse: trüb, etwas Sonne.

Dauer der Exposition .	3 Stunden		5 Stunden		Kontroll	
Wachstum am	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag
Bouillon ungefärbt in offenen Schälchen .	++	+++	+	+	++	++
Bouillon mit Eosin gef. in offenen Schälchen	++	++	0	L	++	++
Bouillon mit Erythrosin gef. in off. Schälchen	0	0	0	0	++	++
Bouillon ungefärbt in bedeckten Schälchen	++	+++	+	++		
Bouillon mit Eosin gef. in bedeckten Schälchen .	++	++	L	+		
Bouillon mit Erythrosin gef. in bed. Schälchen	+	+	L	L		

Resümee. Unter den angegebenen Versuchsbedingungen wurden Streptokokken und Diphtheriebazillen durch das Sonnenlicht bzw. diffuse Tageslicht nach etwa 5—6 Stunden Belichtung in ihrer Weiterentwicklung gehemmt. Wurde die Kultur mit Eosin oder mit Erythrosin gefärbt, so erfolgte die Abtötung schon nach 2—3 Stunden Belichtung.

Passieren die Lichtstrahlen vor ihrer Einwirkung auf das Substrat rotes Glas, so tritt die bakterizide Wirkung des Lichtes nicht deutlich ein, d. h. es läfst sich dann selbst nach 24 stündiger Belichtung an den ungefärbten Kulturen keine, an den gefärbten nur eine teilweise Wachstumshemmung konstatieren. Ein Vergleich mit der Wirkung des direkten Lichtes ist nicht möglich, da eine genaue Messung der Lichtintensität unter dem Rubinglaskasten nicht vorgenommen worden ist.

Wie frühere Versuche schon ergeben haben, beweisen auch unsere Resultate, dafs der Luftzutritt die bakterizide Wirkung des Lichtes bedeutend erhöht. Wurde der Sauerstoff der Luft abgehalten, so blieb auch nach länger dauernder Belichtung die bakterizide Wirkung des Lichtes aus oder war dieselbe eine sehr geringe.

Die Einwirkung der Wärme war bei unseren Versuchen jedenfalls sehr gering, indem dieselben in den Monaten Januar und Februar vorgenommen wurden, wo ja die Wärmeproduktion des Sonnenlichtes bei relativ starker Lichtintensität noch eine geringe ist.

2. Wirkung auf Virulenz der Bakterien.

Die folgenden Versuche wurden in gleicher Weise wie die vorher beschriebenen mit Bouillonkulturen bzw. Aufschwemmungen von virulenten Streptokokken und Diphtheriebazillen vorgenommen.

Mit den Streptokokkenkulturen wurden sodann weiſse Mäuse subkutan am Rücken injiziert, die Diphtheriebazillenaufschwemmungen wurden Meerschweinchen subkutan am Bauche eingespritzt. Zugleich mit diesen Injektionen wurden jeweils drei Tropfen der betreffenden Kultur auf Schrägagar überimpft, um die Wirkung des Lichtes auf Entwicklungshemmung und auf Virulenzschwächung nebeneinander beobachten zu können. Es wurden auch stets Kontrollinjektionen, wie angegeben, mit nicht belichteten Kulturen vorgenommen.

I. Versuche mit Diphtheriebazillen.

a) Exposition am Tageslicht.

30. I. Diphtheriebazillenaufschwemmung wird ungefärbt, mit Eosin bzw. Erythrosin gefärbt dunkel und 1, $2^1/_2$ und 4 Stunden am Tageslicht exponiert. Die 4 Stunden exponierte Kultur wird zum Tierversuch benutzt.

Lichtverhältnisse: trüb, keine Sonne.

Tierversuch abends 5 Uhr.

Meerschweinchen Nr. 1, 165 g schwer.

Subkutane Injektion von 2,0 ccm Diphtheriebouillon, ungefärbt, nicht exponiert.

Tod nach 2 Tagen.

Meerschweinchen Nr. 2, 175 g schwer.

Subkutane Injektion von 2,0 ccm Diphtheriebouillon mit Eosin gefärbt, nicht exponiert.

Tod nach 2 Tagen.

Meerschweinchen Nr. 3, 180 g schwer.

Subkutane Injektion von 2,0 ccm Diphtheriebouillon mit Erythrosin gefärbt, nicht exponiert.

Tod nach 2 Tagen.

Meerschweinchen Nr. 4, 185 g schwer.

Subkutane Injektion von 2,0 ccm Diphtheriebouillon ungefärbt, 4 Stunden exponiert.

Tod nach 2 Tagen.

Meerschweinchen Nr. 5, 175 g schwer.

Subkutane Injektion von 2,0 ccm Diphtheriebouillon mit Eosin gefärbt, 4 Stunden exponiert.

Tod nach 9 Tagen.

Meerschweinchen Nr. 6, 175 g schwer.

Subkutane Injektion von 2,0 ccmDiphtheriebouillon mit Erythrosin gefärbt, 4 Stunden exponiert.

Bleibt am Leben.

Bei allen gestorbenen Tieren werden durch Sektion die für Diphtherie typischen Veränderungen: subkutanes pseudomembranöses Ödem, Rötung der Nebennieren und kulturell Diphtheriebazillen nachgewiesen.

b) Exposition am Tageslicht und unter Rubinglaskasten.

16. II. Diphtheriebazillenaufschwemmung wird ungefärbt, mit Eosin bzw. Erythrosin gefärbt, 4 Stunden direkt am Lichte, 7 und 14 Stunden unter Rubinglaskasten exponiert.

Lichtverhältnisse: Sonne, zeitweise trübe.

17. II. Tierversuch abends 5 Uhr.

Meerschweinchen Nr. 7, 210 g schwer.

Subkutane Injektion von 2,0 ccm mit Erythrosin gefärbter, nicht exponierter Diphtheriebouillon-Kontroll.

Tod nach $2^1/_2$ Tagen.

Meerschweinchen Nr. 8, 215 g schwer.

Subkutane Injektion von 2,0 ccm ungefärbter, 4 Stunden direkt exponierter Diphtheriebouillon.

Tod nach 2 Tagen.

Meerschweinchen Nr. 9, 200 g schwer.

Subkutane Injektion von 2,0 ccm mit Eosin gefärbter, 4 Stunden direkt exponierter Diphtheriebouillon.

Bleibt am Leben.

Meerschweinchen Nr. 10, 220 g schwer.

Subkutane Injektion von 2,0 ccm mit Erythrosin gefärbter, 4 Stunden direkt exponierter Diphtheriebouillon.

Bleibt am Leben.

Meerschweinchen Nr. 11, 680 g schwer.

Subkutane Injektion von 2,0 ccm ungefärbter Diphtheriebouillon, 14 Stunden unter Rubinglaskasten exponiert.

Tod nach $2^1/_2$ Tagen.

Meerschweinchen Nr. 12, 570 g schwer.

Subkutane Injektion von 2,0 ccm mit Eosin gefärbter Diphtheriebouillon 14 Stunden unter Rubinglaskasten exponiert.

Tod nach $2^1/_2$ Tagen.

Meerschweinchen Nr. 13, 520 g schwer.

Subuktane Injektion von 2,0 ccm mit Erythrosin gefärbter Diphtheriebouillon, 14 Stunden unter Rubinglaskasten exponiert.

Tod nach 8 Tagen.

Bei allen gestorbenen Tieren wird durch Sektion und kulturellen Versuch Diphtherie als Todesursache nachgewiesen.

Das Wachstum auf Agar gibt folgende Resultate:

Versuch a.

Dauer d. Exposition	1 Stunde		$2^1/_2$ Stunden		4 Stunden		Kontroll	
Wachstum am . .	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag
Bouillon ungefärbt	++	++	++	++	++	++	++	++
Bouillon mit Eosin gefärbt	++	++	+	++	+	++	++	++
Bouillon mit Erythrosin gefärbt .	++	++	+	+	0	L	++	++

Versuch b.

Exposition am Tageslicht	4 Stunden		Kontroll	
Wachstum am . . .	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag
Bouillon ungefärbt .	++	++	+++	+++
Bouillon mit Eosin gefärbt	0	0	+++	+++
Bouillon mit Erythrosin gefärbt . . .	0	0	+++	+++

Exposition unter Rubinglaskasten	7 Stunden		14 Stunden		Kontroll	
Wachstum am	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag
Bouillon ungefärbt . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Bouillon mit Eosin gefärbt	++	++	++	+++	+++	+++
Bouillon mit Erythrosin gefärbt	++	++	+	++	+++	+++

II. Versuche mit Streptokokken.

a) Exposition am Tageslicht.

31. I. Streptokokkenbouillon wird ungefärbt, mit Eosin, bzw. Erythrosin gefärbt dunkel und $1^1/_2$, 3, $4^1/_2$ und 6 Stunden am Tageslicht exponiert.

Die 3 Stunden exponierte Kultur wird zum Tierversuch benutzt.

Lichtverhältnisse: trüb, zeitweise etwas Sonne.

Tierversuch abends 6 Uhr.

Maus Nr. 1.

Subkutane Injektion von 0,1 ccm ungefärbter, nicht exponierter Bouillon.

Tod nach 2 Tagen.

Maus Nr 2.

Subkutane Injektion von 0,1 ccm mit Eosin gefärbter, nicht exponierter Bouillon.

Tod nach 2 Tagen.

Maus Nr. 3.

Subkutane Injektion von 0,1 ccm mit Erythrosin gefärbter, nicht exponierter Bouillon.

Tod nach 2 Tagen.

Maus Nr. 4.

Subkutane Injektion von 0,1 ccm ungefärbter, 3 Stunden exponierter Bouillon.

Tod nach 2 Tagen.

Maus Nr. 5.

Subkutane Injektion von 0,1 ccm mit Eosin gefärbter, 3 Stunden exponierter Bouillon.

Bleibt am Leben.

Maus Nr. 6.

Subkutane Injektion von 0,1 ccm mit Erythrosin gefärbter, 3 Stunden exponierter Bouillon.

Bleibt am Leben.

Bei allen gestorbenen Mäusen werden durch Überimpfung des Herzblutes auf Schrägagar und mikroskopische Untersuchung Streptokokken nachgewiesen.

b) Exposition unter Rubinglaskasten.

13. II. Streptokokkenbouillon wird ungefärbt, mit Eosin bzw. Erythrosin gefärbt 7 und 14 Stunden unter Rubinglaskasten exponiert.

Lichtverhältnisse: Sonne, zeitweise trübe.

14. II. Tierversuch abends 4 Uhr.

Maus Nr. 7.

Subkutane Injektion von 0,1 ccm ungefärbter nicht exponierter Bouillon-Kontroll.

Tod nach 1 Tag.

Maus Nr. 8.

Subkutane Injektion von 0,1 ccm ungefärbter Bouillon, 14 Stunden unter Rubinglaskasten exponiert.

Tod nach $1^1/_2$ Tag.

Maus Nr. 9.

Subkutane Injektion von 0,1 ccm mit Eosin gefärbter Bouillon, 14 Stunden unter Rubinglaskasten exponiert.

Tod nach 1 Tag.

Maus Nr. 10.

Subkutane Injektion von 0,1 ccm Bouillon, mit Erythrosin gefärbt, 14 Stunden unter Rubinglaskasten exponiert.

Tod nach $1^1/_2$ Tagen.

Bei allen gestorbenen Mäusen werden kulturell im Herzblut Streptokokken nachgewiesen.

Das Wachstum auf Agar ergab folgende Resultate:

Versuch a.

Dauer d. Exposition	$1^1/_2$ Stunden		3 Stunden	
Wachstum am	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag
Bouillon ungefärbt	+++	+++	+++	+++
Bouillon mit Eosin gefärbt	++	++	+	+
Bouillon mit Erythrosin gefärbt	L	L	L	L

Dauer der Exposition	$4^1/_2$ Stunden		6 Stunden		Kontroll	
Wachstum am	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag
Bouillon ungefärbt	++	++	L	+	+++	+++
Bouillon mit Eosin gefärbt	+	+	L	L	+++	+++
Bouillon mit Erythrosin gefärbt	0	L	0	L	+++	+++

Versuch b.

Dauer der Exposition .	7 Stunden		14 Stunden		Kontroll	
Wachstum am	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag
Bouillon ungefärbt . .	++	++	++	++	++	++
Bouillon mit Eosin gefärbt	++	++	++	++	++	++
Bouillon mit Erythrosin gefärbt	++	++	L	L	++	++

c) Prüfung der Virulenz von exponierten Streptokokkenkulturen.

Diese Versuche wurden unternommen, um festzustellen, ob ein Streptokokkus, welcher nach Exposition am Lichte Tiere nicht mehr tötete, obschon die Kulturen noch Wachstum ergaben, dauernd abgeschwächt ist.

1. Versuch.

12. V. Streptokokkenbouillon wird ungefärbt, mit Eosin resp. Erythrosin gefärbt dunkel und am Lichte 2, 4 und 6 Stunden exponiert.

Die Exposition wird, um die Verdunstung der Kulturen bei der ziemlich intensiven Sonne zu vermeiden, statt in Doppelschälchen wie gewöhnlich in Reagenzröhrchen vorgenommen, wo die Wirkung des Lichtes weniger deutlich ist.

Lichtverhältnisse: Sonne.

13. V. Tierversuch mittags 11 Uhr.

Maus Nr. 1.

Subkutane Injektion von 0,1 ccm mit Erythrosin gefärbter, nicht exponierter Bouillon-Kontroll.

Tod nach 2 Tagen.

Maus Nr. 2.

Subkutane Injektion von 0,1 ccm mit ungefärbter, 6 Stunden exponierter Bouillon.

Tod nach 4 Tagen.

Maus Nr. 3.

Subkutane Injektion von 0,1 mit Eosin gefärbter, 6 Stunden exponierter Bouillon.

Bleibt am Leben.

Maus Nr. 4.

Subkutane Injektion von 0,1 ccm mit Erythrosin gefärbter, 6 Stunden exponierter Bouillon.

Bleibt am Leben.

Bei den gestorbenen Mäusen werden durch Sektion und kulturellen Versuch im Herzblute Streptokokken nachgewiesen.

Das Wachstum auf Agar ergab folgendes Resultat:

Dauer d. Exposition	2 Stunden		4 Stunden		6 Stunden		Kontroll	
Wachstum am . .	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag
Bouillon ungefärbt	++	++	++	++	+	+		
Bouillon mit Eosin gefärbt	++	++	+	++	L	+		
Bouillon mit Erythrosin gefärbt .	++	++	L	+	0	0	+++	+++

2. Versuch.

15. V. Die von den 6 Stunden exponiert gewesenen Streptokokken kulturen aus Versuch 1, welche für die damit injizierten Mäuse nicht mehr oder abgeschwächt virulent waren, angelegten Agarkulturen werden zur Weiterzüchtung auf Bouillon überimpft. Die von der ungefärbten und von der mit Eosin gefärbten exponierten Kultur herrührende Bouillon ist stark getrübt, die von der mit Erythrosin gefärbten exponierten Kultur herrührende zeigt kein Wachstum.

15. V. Tierversuch mittags 2 Uhr.

Maus Nr. 1.

Subkutane Injektion von 0,1 ccm Bouillon, herrührend von ungefärbt exponiert gewesener Streptokokkenkultur.

Tod nach 2 Tagen.

Maus Nr. 2.

Subkutane Injektion von 0,1 ccm Bouillon, herrührend von mit Eosin gefärbt exponiert gewesenen Streptokokkenkultur.

Tod nach 2 Tagen.

Bei den gestorbenen Mäusen werden durch kulturellen Versuch im Herzblut Streptokokken nachgewiesen.

Resümee. Der Zusatz von sensibilisierenden Farbstoffen hat nicht nur auf das Wachstum, sondern auch auf die Virulenz der pathogenen Mikroorganismen einen sehr deutlichen Einflufs. Es stellte sich heraus, dafs sehr virulente Streptokokkenkulturen, welche in Mengen von 0,0001 ccm Mäuse eben noch sicher töteten, selbst in einer Menge von 0,1 ccm nicht mehr den Tod der Versuchstiere hervorrufen, wenn sie, mit Eosin oder mit Erythrosin vermengt, 3—4 Stunden lang am Tageslicht exponiert wurden, während die ungefärbte exponierte Kultur in der Menge von 0,1 ccm, ähnlich wie die nicht exponierte, ungefärbt und gefärbte wirkte, also rasch den Tod der Tiere herbei-

führte. Ähnliches ergaben die Versuche mit Diphtheriebazillen an Meerschweinchen. Während eine Bouillonaufschwemmung einer Serumkultur, in der Menge von 2,0 ccm ungefärbt dem Lichte 4 Stunden exponiert, das Tier innerhalb 2 Tagen tötete, wirkte die exponierte Kultur nicht mehr tödtlich, wenn sie vorher mit Eosin oder Erythrosin versetzt worden war.

Bei den Versuchen unter dem Rubinglaskasten konnte konstatiert werden, dafs die durch rotes Glas filtrierten Lichtstrahlen die Virulenz von Bakterien ebenso wenig abzuschwächen vermögen als ihre Entwicklungsfähigkeit und zwar selbst bei tagelanger Exposition.

Wie dies schon von anderen Autoren beobachtet worden ist, haben auch unsere Versuche ergeben, dafs die Abschwächung bzw. das Verlorengehen der Virulenz früher eintritt als die völlige Abtötung der Bakterien. Einzelne exponierte, sensibilisierte Kulturen ergaben noch Wachstum, währenddem die injizierten Tiere am Leben blieben; immerhin beweisen die angeführten Resultate, dafs Wachstumshemmung und Virulenzabnahme Hand in Hand gehen.

Sehr interessant ist auch das Resultat des letzten Versuches, dafs nämlich durch Weiterzüchtung einer exponierten Kultur von virulenten Streptokokken, welche die damit injizierte Maus nicht mehr getötet hatte, eine Kultur erhalten wurde, die sich wieder als voll virulent erwies; wir konnten also eine dauernde Abschwächung in diesem einen Versuche nicht nachweisen.

Zweiter Abschnitt.

Wirkung des Lichtes auf Toxine und Antitoxine.

Kitasato (16) hat in seinen experimentellen Untersuchungen über Tetanusgift die Einwirkung des Lichtes auf dasselbe durch zahlreiche Tierversuche genau geprüft. Er fand, dafs das Filtrat einer Bouillonkultur von Tetanusbazillen durch Aufstellen am Fenster bei zerstreutem Tageslichte allmählich seine Wirksamkeit verlor; es dauerte aber lange Zeit, bis die Giftwirkung vollständig

verschwand. Durch Aufstellen direkt an Sonnenlicht verlor das Tetanusgift erst nach 15—18 Stunden vollständig seine Wirksamkeit.

Das Diphtheriegift erwies sich atmosphärischen Einflüssen, also auch dem Lichte gegenüber, widerstandsfähiger.

Tizzoni und Cattani (17) fanden ebenfalls, dafs Sonnenlicht imstande ist, das Tetanustoxin bald unwirksam zu machen, namentlich wenn der Zutritt des Sauerstoffes der Luft leicht möglich war.

Auch Fermi und Celli (18) konstatierten, dafs das Tetanusgift, dem direkten Sonnenlichte ausgesetzt, wobei die Temperatur zwischen 40—50° schwankte, nach 8 Stunden zerstört wurde. Bei einer Temperatur von nicht mehr als 37° blieb das Gift, an der Sonne exponiert, 15 Stunden lang wirksam.

Tappeiner und Jodlbauer (19) haben die Wirkung des Lichtes auf mit fluoreszierenden Stoffen gefärbtes Diphtherietoxin und Tetanustoxin geprüft. Bezüglich der Versuche mit Diphtherietoxin schreibt Tappeiner: »Man sieht, dafs der Zusatz von Eosin im Dunkeln auf das Toxin nicht ganz ohne Einflufs war, in gleicher Weise wie der Zutritt des Lichtes im Glas ohne Eosin. Die Schädigung ist indes in beiden Fällen unbedeutend, nur bei der einfachen und doppelten letalen Dosis in Form einer Verzögerung des letalen Ausganges von $^1/_2$—1 Tag bemerkbar. Wahrhaft erstaunlich aber ist die Wirkung auf das Toxin durch Eosin am Lichte. Sämtliche Tiere bis inklusive den mit der 120fachen Dosis letalis injizierten blieben vollkommen normal.«

Die 1—10fache dosis letalis des Tetanustoxins wird ertragen bis auf lokalen Tetanus, die 25fache Dosis ist letal.

Eine mit Tetanusantitoxin durchgeführte gröfsere Versuchsreihe ergab eine analoge Wirkung auf Antitoxine.

Schon früher hatte Tappeiner (20) gezeigt, dafs Rizin, in Lösung mit etwas Eosin, 14 Stunden zerstreutem Tageslicht ausgesetzt, sein charakteristisches Agglutinationsvermögen für rote Blutkörperchen vollkommen verloren hatte, während eine ebenso lang exponierte, einfache Rizinlösung und eine mit Eosin versetzte, im Dunkeln aufbewahrte Lösung unverändert wirksam waren.

In den folgenden Versuchen wurde Diphtherietoxin und Antitoxin, das wir der Freundlichkeit des Berner Seruminstitutes verdanken, benutzt, ferner Tetanustoxin und Antitoxin, das wir von den Höchster Farbwerken bezogen.

Das Diphtherietoxin, ohne und mit Zusatz von Antitoxin, wurde Meerschweinchen von durchschnittlich 150—200 g Gewicht subkutan am Bauche injiziert. Da die Wertigkeit der Präparate nicht angegeben war, wurde dieselbe experimentell festgestellt und dabei gefunden, dafs 0,05 ccm Toxin den Tod der Versuchstiere in ca. 48 Stunden herbeiführte. Wurde 0,5 ccm Toxin einer Menge von 0,005 ccm Antitoxin beigefügt, das Gemisch ca. 1 Stunde lang aufbewahrt und dann injiziert, blieben die Tiere am Leben; bekamen sie in gleicher Weise 0,5 ccm Toxin und 0,001 ccm Antitoxin, starben sie nach ca. 48 Stunden.

Die Wertigkeit des Höchster Tetanustoxin war angegeben für 1,0 g festes Toxin = 150 000 000+Ms, die des flüssigen Tetanusantitoxins war diejenige eines fünffachen Normalserums, also sollte 0,1 ccm Antitoxin 0,15 g Toxin neutralisieren. In unseren Versuchen waren wir genötigt, mit ziemlich höheren Dosen von Toxin und etwas kleineren von Antitoxin zu arbeiten.

Die Wirksamkeit des Tetanustoxins wurde an Mäusen und Meerschweinchen erprobt und dabei gefunden, dafs bei Mäusen 0,0000125 ccm Toxin innerhalb zweimal 24 Stunden den Tod an Tetanus herbeiführte, bei Meerschweinchen 0,00025 ccm innerhalb 36 Stunden. Eine mit 0,00125 ccm Toxin + 0,001 ccm Antitoxin injizierte Maus starb nach ca. 18 Stunden, eine mit einem gleich wie oben hergestellten Gemenge von 0,001 ccm Toxin + 0,0005 ccm Antitoxin injizierte blieb am Leben.

Die zu injizierenden Mengen wurden durch Verdünnen des Diphtherietoxins und Serums mit steriler Bouillon, die des Tetanustoxins und Serums durch Auflösen, resp. Verdünnen mit sterilem Wasser hergestellt. Die Toxine und Antitoxine wurden im Freien exponiert und zwar teils ungefärbt, teils mit Eosin 1‰ gefärbt, daneben wurden immer Kontrollösungen direkt exponiert. Die Exposition fand teils in bedeckten, gewöhnlich in unbedeckten Glasschälchen statt.

Die Versuche wurden immer mit sehr grofsen Mengen Toxin, bzw. Toxin und Antitoxin ausgeführt behufs Erlangung unzweideutiger Resultate.

I. Exposition von Toxinen am Tageslichte.

1. Versuch mit Diphtherietoxin.

27. IV. Diphtherietoxin wird ungefärbt und mit Eosin gefärbt dunkel und am Tageslichte in bedeckten und offenen Doppelschälchen 4 Stunden exponiert.

Lichtverhältnisse: 2 Stunden Sonne, 2 Stden trüb.

Tierversuch. Abends 4 Uhr.

Meerschweinchen Nr. 1.

Subkutane Injektion von 0,05 ccm Diphtherietoxin, ungefärbt, nicht exponiert.

Tod nach 2 Tagen.

Meerschweinchen Nr. 2.

Subkutane Injektion von 0,05 ccm Diphtherietoxin, mit Eosin gefärbt nicht exponiert.

Tod nach 2 Tagen.

Meerschweinchen Nr. 3.

Subkutane Injektion von 0,05 ccm Diphtherietoxin, ungefärbt, in bedeckter Schale exponiert.

Tod nach 2 Tagen.

Meerschweinchen Nr. 4.

Subkutane Injektion von 0,05 ccm Diphtherietoxin, mit Eosin gefärbt, in bedeckter Schale exponiert.

Bleibt am Leben.

Meerschweinchen Nr. 5.

Subkutane Injektion von 0,05 ccm Diphtherietoxin, ungefärbt, in offener Schale exponiert.

Tod nach 2 Tagen.

Meerschweinchen Nr. 6.

Subkutane Injektion von 0,05 ccm Diphtherietoxin, mit Eosin gefärbt, in offener Schale exponiert.

Bleibt am Leben.

Bei allen gestorbenen Tieren werden bei der Sektion die für Diphtherie typischen Veränderungen gefunden.

2. Versuch mit Tetanustoxin.

3. V. Tetanustoxin wird ungefärbt und mit Eosin gefärbt dunkel und am Tageslichte 4 Stunden exponiert.

Lichtverhältnisse: Sonne, zeitweise trüb.

Tierversuch abends 4 Uhr.

Meerschweinchen Nr. 1.

Subkutane Injektion von 0,00025 ccm Tetanustoxin, ungefärbt, nicht exponiert.

Tod nach 2 Tagen.

Meerschweinchen Nr. 2.

Subkutane Injektion von 0,00025 ccm Tetanustoxin, mit Eosin gefärbt, nicht exponiert.

Tod nach 2 Tagen.

Meerschweinchen Nr. 3.

Subkutane Injektion von 0,00025 ccm Tetanustoxin, ungefärbt, exponiert.

Tod nach 2 Tagen.

Meerschweinchen Nr. 4.

Subkutane Injektion von 0,00025 ccm Tetanustoxin, mit Eosin gefärbt, exponiert.

Bleibt am Leben.

Der Tod aller drei gestorbenen Tiere trat unter deutlich tetanischen Symptomen ein.

II. Exposition von Antitoxinen am Tageslichte.

3. Versuch mit Diphtherieantitoxin.

10. V. Diphtherieantitoxin wird ungefärbt und mit Eosin gefärbt dunkel und am Tageslichte 4 Stunden exponiert. Das exponierte Antitoxin wird im Dunkeln aufbewahrt gewesenem Diphtherietoxin beigemischt, ca. 1 Stunde stehen gelassen und dann injiziert.

Lichtverhältnisse: Sonne.

Tierversuch abends $5\frac{1}{2}$ Uhr.

Meerschweinchen Nr. 1.

Subkutane Injektion von 0,0025 ccm Antitoxin, ungefärbt, nicht exponiert + 0,25 ccm Toxin.

Bleibt am Leben.

Meerschweinchen Nr. 2.

Subkutane Injektion von 0,0025 ccm Antitoxin, mit Eosin gefärbt, nicht exponiert + 0,25 ccm Toxin.

Bleibt am Leben.

Meerschweinchen Nr. 3.

Subkutane Injektion von 0,0025 ccm Antitoxin, ungefärbt, exponiert + 0,25 ccm Toxin.

Tod nach 2 Tagen.

Meerschweinchen Nr. 4.

Subkutane Injektion von 0,0025 ccm Antitoxin, mit Eosin gefärbt, exponiert + 0,25 ccm Toxin.

Tod nach 2 Tagen.

Die Krankheitssymptome traten bei diesem Tiere etwas früher ein als bei Nr. 3.

Die Sektion der gestorbenen Tiere ergibt die für Diphtherie typischen Veränderungen.

4. Versuch mit Tetanusantitoxin.

10. V. Tetanusantitoxin wird ungefärbt und mit Eosin gefärbt dunkel und am Tageslichte 4 Stunden exponiert. Das exponierte Antitoxin wird mit im Dunkeln aufbewahrt gewesenem Tetanustoxin vermischt, ca. 1 Stunde stehen gelassen und dann injiziert.

Lichtverhältnisse: Sonne.

Tierversuch abends 5 Uhr.

Maus Nr. 1.

Subkutane Injektion von 0,0005 ccm Antitoxin, ungefärbt, nicht exponiert + 0,001 ccm Toxin.

Bleibt am Leben.

Maus Nr. 2.

Subkutane Injektion von 0,0005 ccm Antitoxin, mit Eosin gefärbt, nicht exponiert + 0,001 ccm Toxin.

Bleibt am Leben.

Maus Nr. 3.

Subkutane Injektion von 0,0005 ccm Antitoxin, nicht gefärbt, exponiert + 0,001 ccm Toxin.

Bleibt am Leben.

Die Maus zeigt die ersten Tage nach der Injektion leichte tetanische Symptome.

Maus Nr. 4.

Subkutane Injektion von 0,0005 ccm Antitoxin, mit Eosin gefärbt, exponiert + 0,001 ccm Toxin.

Tod nach 3 Tagen.

Der Tod des gestorbenen Tieres erfolgte unter deutlichen Erscheinungen von Tetanus.

III. Exposition von Antitoxinen am Tageslichte und unter Rubinglaskasten.

5. Versuch mit Diphtherieantitoxin.

17. V. Exposition von Diphtherieantitoxin, ungefärbt und mit Eosin gefärbt unter Rubinglaskasten und am Tageslichte 4 Stunden. Dem exponierten Antitoxin wird nicht exponiertes Diphtherietoxin zugefügt, die Mischung ca. 1 Stunde stehen gelassen und dann injiziert.

Lichtverhältnisse: Sonne.

Tierversuch abends 4 Uhr.

Meerschweinchen Nr. 1.

Subkutane Injektion von 0,0025 ccm Antitoxin, ungefärbt, unter Rubinglaskasten exponiert + 0,25 ccm Toxin.

Bleibt am Leben.

Meerschweinchen Nr. 2.

Subkutane Injektion von 0,0025 ccm Antitoxin mit Eosin gefärbt, unter Rubinglaskasten exponiert + 0,25 ccm Toxin.

Bleibt am Leben.

Meerschweinchen Nr. 3.

Subkutane Injektion von 0,0025 ccm Antitoxin, ungefärbt, direkt exponiert + 0,25 ccm Toxin.

Tod nach 2 Tagen.

Meerschweinchen Nr. 4.

Subkutane Injektion von 0,0025 ccm Antitoxin, mit Eosin gefärbt, direkt exponiert + 0,25 ccm Toxin.

Tod nach 2 Tagen.

Die Sektion der gestorbenen Tiere ergab die für Diphtherie typischen Veränderungen.

6. Versuch mit Tetanusantitoxin.

14. V. Exposition von Tetanusantitoxin, ungefärbt und mit Eosin gefärbt, unter Rubinglaskasten und am Tageslicht 4 Stunden. Das exponiert gewesene Antitoxin wird vermischt mit nicht exponiertem Tetanustoxin, ca. 1 Stunde stehen gelassen und dann injiziert.

Lichtverhältnisse: Sonne.

Tierversuch abends $4\frac{1}{2}$ Uhr.

Maus Nr. 1.

Subkutane Injektion von 0,0005 ccm Antitoxin, nicht gefärbt, unter Rubinglaskasten exponiert + 0,00125 ccm Toxin.

Bleibt am Leben.

Maus Nr. 2.

Subkutane Injektion von 0,0005 ccm Antitoxin, mit Eosin gefärbt, unter Rubinglaskasten exponiert + 0,00125 ccm Toxin.

Bleibt am Leben.

Maus Nr. 3.

Subkutane Injektion von 0,0005 ccm Antitoxin, ungefärbt, direkt exponiert + 0,00125 ccm Toxin.

Bleibt am Leben.

Maus Nr. 4.

Subkutane Injektion von 0,0005 ccm Antitoxin, mit Eosin gefärbt, direkt exponiert + 0,00125 ccm Toxin.

Tod nach $1\frac{1}{2}$ Tagen.

Der Tod der Maus erfolgte unter deutlichen tetanischen Symptomen.

Resümee. Aus den mitgeteilten Versuchen erhellt, dafs die Wirksamkeit von Diphtherie- und Tetanustoxin durch eine Exposition am Tageslichte von 4 Stunden herabgesetzt wird und dafs diese Einwirkung besonders an dem mit Eosin gefärbten Toxin gegenüber dem nicht gefärbten zutage tritt, so dafs eine für das betreffende Tier mindestens 100fach letale Dosis nicht mehr tödlich wirkt, sondern höchstens noch vorübergehende Vergiftungssymptome bewirkt, wie dies an den mit Tetanus injizierten Tieren etwa beobachtet wurde.

Auch auf die Diphtherie- und Tetanusantitoxine war deutlich der schädigende Einflufs des Lichtes mit und ohne Zusatz eines sensibilisierenden Farbstoffes zu erkennen, indem die mit nicht exponiertem Antitoxin plus Toxin injizierten Tiere nicht erkrankten und am Leben blieben, während das exponierte Antitoxin unter denselben Bedingungen eine Neutralisierung des Toxins nicht mehr herbeizuführen im stande war.

Im Gegensatz hierzu vermochte das unter dem Rubinglaskasten exponierte Diphtherie- und Tetanusantitoxin die Wirkung seines entsprechenden Giftes vollständig zu neutralisieren.

IV. Einwirkung des Lichtes auf die hämolytische Wirkung von Tetanustoxin.

Madsen (21) hat interessante Versuche angestellt über die schädigende Wirkung des Tetanustoxins, bzw. des Tetanolysins auf rote Blutkörperchen, wobei er fand, dafs diese schädigende Wirkung durch Tetanusantitoxin unter gewissen Versuchsbedingungen aufgehoben wurde. Unsere Versuche bezweckten nun, nachdem die zerstörende Beeinflussung des Tetanustoxins und Antitoxins am Lichte an Tierexperimenten konstatiert war, diese Lichtwirkung auch noch an hämolytischen Versuchen zu erproben.

1. Versuch.

15. V. Tetanustoxin, ungefärbt und mit Eosin 1‰ gefärbt, ebenso Antitoxin, werden teils an der Sonne 4 Stunden, teils dunkel exponiert.

Tetanusantitoxin wird direkt einem halben ccm einer ca. 5 proz. Kaninchenblut-Aufschwemmung beigefügt und dann Toxin zugesetzt, so dafs zuerst

Antitoxin mit dem Blute ca. 12 Stunden im Kontakt gelassen, nachher mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen und dann das Toxin beigegeben wird.

Es bedeutet:

+++ starke Hämolyse,
++ mittelstarke »
+ schwache »
0 keine »

Das Resultat war nach 12 Stunden folgendes:

Blutlösung mit 0,01 ccm Tetanustoxin nicht exponiert . . .	+++
» » 0,01 » » + Eosin nicht exp. .	+++
» » 0,01 » » exponiert	++
» » 0,01 » » + Eosin exponiert . .	+
» » 0,1 » Tetanusantitoxin nicht exponiert + 0,01 » Tetanustoxin	0
» mit 0,1 » Tetanusantitoxin u. Eosin nicht exp. + 0,01 » Tetanustoxin	0
» mit 0,1 » Tetanusantitoxin exponiert + 0,01 » Tetanustoxin	+
» mit + 0,1 » Tetanusantitoxin + Eosin exponiert + 0,01 » Tetanustoxin	++
» Kontroll nicht exponiert	0
» + Eosin » »	0
» mit Antitoxin 0,1 ccm Kontroll	0
» » » 0,1 » + Eosin exponiert . .	0

2. Versuch.

17. II. Die 4 Stunden am Sonnenlicht exponiert gewesenen Lösungen werden heute noch 2 Stunden bei wenig Sonne exponiert, der Versuch dann in gleicher Weise wiederholt.

Die Resultate nach 12 Stunden waren folgende:

Blutlösung mit 0,01 ccm Tetanustoxin nicht exponiert . . .	+++
» » 0,01 » » + Eosin nicht exp. .	+++
» » 0,01 » » exponiert	++
» » 0,01 » » + Eosin exponiert . .	+
» » 0,1 » Tetanusantitoxin nicht exponiert + 0,01 » Toxin	0
» mit 0,1 » Tetanusantitoxin + Eosin nicht exp. + 0,01 » Toxin	0
» mit 0,1 » Tetanusantitoxin exponiert + 0,01 » Toxin	+
» mit 0,1 » Tetanusantitoxin + Eosin exponiert + 0,01 » Toxin	++

Resümee. Die wenigen hier angeführten Versuche ergeben, dafs die hämolytischen, bzw. antihämolytischen Eigenschaften des Tatanustoxins und Antitoxins durch Exposition am Lichte ähnlich beeinflufst werden wie die rein toxischen bzw. antitoxischen Eigenschaften. Die Wirksamkeit der betreffenden Lösungen wird auch hier bei Zusatz von sensibilisierenden Farbstoffen viel stärker abgeschwächt.

Dritter Abschnitt.

Wirkung des Lichtes auf das Labferment.

Von verschiedenen Seiten wurde die Lichtwirkung auf Enzyme untersucht und zwar machten schon Downes und Blunt (22) Versuche mit Invertinlösungen, welche längere Zeit dem Sonnenlichte ausgesetzt waren. Dieselben zeigten nachher eine erheblich geringere Fähigkeit, Rohrzucker in Traubenzucker umzuwandeln, als die im Dunkeln aufbewahrten Kontrollproben.

Fermi und Pernoni (23) glaubten ebenfalls in ihren Untersuchungen gefunden zu haben, dafs Lösungen von Pepsin und Trypsin im Sonnenlicht mehr abgeschwächt werden als beim Aufbewahren im Dunkeln.

Eine sichere Wirkung des Sonnenlichtes auf Chymosin (Lab) und Maltase (Hefenextrakt) beobachtete Emmerling. (24)

Tappeiner (20) veröffentlichte 1903 und in Gemeinschaft mit Jodlbauer (28) 1904 interessante Mitteilungen über die Wirkung des Sonnenlichtes auf Enzyme bei Anwesenheit fluoreszierender Stoffe. Er fand regelmäfsig, dafs Eosin die Verzuckerung der Stärke in bedeutendem Mafse hemmte, wenn die betreffende Lösung von Diastase dem gewöhnlichen Tageslicht ausgesetzt war.

Im Dunkeln war das Eosin ohne jede Einwirkung, ebenso war Tageslicht für sich allein ohne Einflufs. Die Wirkung trat nicht ein bei Filtration der Lichtstrahlen, indem man das zutretende Licht vorher eine Lösung des im Versuch stehenden fluoreszierenden Stoffes von 10 cm Schichtdicke passieren läfst.

Das zweite untersuchte Enzym war das Invertin, das sich ähnlich wie Diastase verhält. Auch die Wirkung des eiweifs-verdauenden Papayotin wurde durch Eosin im Lichte gehemmt.

Schmidt-Nielsen (26) benutzte zu seinen Versuchen mit Chymosin das konzentrierte, elektrische Bogenlicht; die Belichtung geschah in Quarzkammern. Er hatte nämlich gefunden, dafs das Sonnenlicht und das nicht konzentrierte Licht von elektrischen Bogenlampen nur von schwacher Wirkung auf Enzyme war, ferner dafs die wirksamen ultravioletten Strahlen nicht durchdrangen, wenn eine klare Glasplatte vor die Versuchskammer eingeschoben wurde. Das Chymosin büfste durch Belichtung mit konzentriertem, elektrischem Bogenlichte an Wirksamkeit ein, Versuche mit Erythrosin und Belichtung in der Quarzkammer mit durch Glasfilter filtriertem, konzentriertem Lichte waren negativ.

Zu unseren Versuchen wurde ebenfalls das leicht erhältliche Labferment (Chymosin) benutzt. Dasselbe eignete sich für die Versuche auch deshalb besonders, weil man in der Zeit des Eintreffens der Gerinnung von damit versetzter Milch unter den gewöhnlichen Versuchsanordnungen ziemlich genaue Werte bekam. Es wurde zu den beschriebenen Versuchen eine 1 proz. Lablösung benutzt, welche mittels Auflösen einer käuflichen Labtablette in 100 ccm gewöhnlichen Wassers erhalten wurde. Da die Lösung nicht haltbar ist, wurde zu jedem Versuche eine frische Lösung hergestellt.

Diese Lablösung wurde nun in Reagenzröhrchen teils direkt, teils mit einer 1 ‰ Eosin- resp. Erythrosinlösung versetzt, im Freien exponiert. Ebenso wurden die betreffenden Lösungen in Reagenzröhrchen mit schwarzem Papier umhüllt, also unter Lichtabschlufs zu Kontrollversuchen exponiert.

Für die Prüfung der Gerinnungsfähigkeit dieser Lablösungen wurden dieselben frischer, ungekochter Milch beigefügt und zwar 1 ccm Lablösung auf 100 ccm Milch.

In einigen Versuchen wurde auch Milch der Einwirkung des Lichtes ausgesetzt und nachher mit exponierten und nicht

exponierten Lablösungen die Gerinnungsfähigkeit derselben untersucht. Die Milch wurde dazu in grofsen Doppelschalen ungefärbt und mit 1 ‰ Eosin- bzw. Erythrosinlösung versetzt exponiert. Die Prüfung der Milchgerinnung durch Lab wurde teils im Schäfferschen, teils in einem nach diesem konstruierten gröfseren Apparate, einem viereckigen Blechkasten mit 20 Öffnungen für Bechergläser bei einer Temperatur von etwa 37 °C vorgenommen.

Es wurde bestimmt, innerhalb welcher Zeit bei den verschiedenen Gemischen eine deutliche Gerinnung der Milch eintrat und diese Zeit in Minuten notiert.

I. Versuche mit Lab und Milch ohne und mit Zusatz von Eosin.

100 ccm Milch werden mit 1 ccm Lablösung vermengt; die Zahlen geben die Minuten an, welche zwischen Labzusatz und Gerinnung verstreichen. In den folgenden Tabellen wird die Vorbehandlung von Milch und von Lab (exponiert, nicht exponiert; ungefärbt, mit Eosin gefärbt) mitgeteilt.

18. I. Lab, ungefärbt und mit Eosin gefärbt, Milch ungefärbt und mit Eosin gefärbt, werden dunkel und am Lichte 6 Stunden exponiert.

Lichtverhältnisse: trüb, keine Sonne.

Milch	Lab	Lab exponiert	Lab nicht expon. (Kontroll)
1. nicht exponiert ungefärbt	ungefärbt	6	6
	mit Eosin gefärbt .	8	8
2. nicht exponiert mit Eosin gefärbt	ungefärbt	16	12
	mit Eosin gefärbt .	20	16
3. exponiert ungefärbt	ungefärbt	18	12
	mit Eosin gefärbt .	26	24
4. exponiert mit Eosin gefärbt	ungefärbt	55	55
	mit Eosin gefärbt .	120	65

II. Versuche mit Lab und Milch, ungefärbt und mit Zusatz von Erythrosin.

19. I. Lab, ungefärbt und mit Erythrosin gefärbt, Milch ungefärbt und mit Erythrosin gefärbt, werden dunkel und am Lichte 6 Stunden exponiert.

Lichtverhältnisse: trübe, keine Sonne.

Milch	Lab	Lab exponiert	Lab nicht expon. (Kontroll)
1. nicht exponiert ungefärbt	ungefärbt	8	8
	mit Erythrosin gef.	65	10
2. nicht exponiert mit Erythr. gefärbt	ungefärbt	15	15
	mit Erythrosin gef.	nach 100 Min. keine Gerinnung	20
3. exponiert ungefärbt	ungefärbt	18	18
	mit Erythrosin gef.	70	30
4. exponiert mit Erythr. gefärbt	ungefärbt	80	70
	mit Erythrosin gef.	nach 140 Min. keine Gerinnung	110

III. Vergleichende Versuche mit getrennt und mit gemeinsam exponierten Lab- und Farbstofflösungen.

26. I. Exposition von 1 ‰ Lablösung, 1 ‰ Eosinlösung getrennt und 1 ‰ Lablösung gemeinsam mit 1 ‰ Eosinlösung dunkel und 4 Stunden am Tageslichte.

Lichtverhältnisse: Sonne, zeitweise trübe.

Milch	Lab	Lab exponiert	Lab nicht expon. (Kontroll)
nicht exponiert ungefärbt	ungefärbt	14	12
	mit Eosin gefärbt getrennt exponiert	12	12
	mit Eosin gefärbt zusammen exponiert	120	15

20. I. Exposition von 1 % Lablösung, 1 ‰ Erythrosinlösung, getrennt und 1 % Lablösung gemeinsam mit 1 % Erythrosinlösung dunkel und am Tageslichte 6 Stunden.

Lichtverhältnisse: trüb, keine Sonne.

Milch	Lab	Lab exponiert	Lab nicht expon. (Kontroll)
nicht exponiert ungefärbt	ungefärbt	12	12
	mit Erythrosin gefärbt getrennt exponiert	16	15
	mit Erythrosin gefärbt zusammen exponiert	75	18

IV. Versuch mit 12 Stunden aufbewahrter Lablösung.

21. I. Die am 20. I. 6 Stunden exponierten Lösungen werden über Nacht, ca. 12 Stunden, im Eisschrank aufbewahrt und heute nochmals auf ihre Wirksamkeit geprüft.

Milch	Lab	Lab exponiert	Lab nicht expon. (Kontroll)
nicht exponiert ungefärbt	ungefärbt	14	12
	mit Erythrosin gefärbt getrennt aufbewahrt	18	15
	mit Erythrosin gefärbt zusammen aufbewahrt	100	22

V. Versuche mit Exposition der Lablösungen bei Luftzutritt und Luftabschlufs.

3. II. Lab, ungefärbt und mit Eosin resp. Erythrosin gefärbt, wird teils in Reagenzröhrchen unter Luftzutritt, teils unter Luftabschlufs in geschlossenen Glaszylindern nach Absaugen der Luft 4 Stunden exponiert.

Lichtverhältnisse: Sonne, zeitweise trübe.

Nicht exponierte Milch wird versetzt mit:

Lab	bei Luftzutritt exponiert	bei Luftabschl. exponiert	nicht exponiert
ungefärbt	10	10	10
mit Eosin gefärbt . .	Nach 120 Min. keine Gerinnung	120	12
mit Erythrosin gefärbt	Nach 120 Min. keine Gerinnung	120	20

6. II. Milch ungefärbt und mit Eosin resp. Erythrosin gefärbt, wird teils in offenen Glaszylindern unter Luftzutritt, teils unter Luftabschlufs in geschlossenen Glaszylindern nach Absaugen der Luft 4 Stunden exponiert.

Lichtverhältnisse: Sonne.

Nicht exponiertes Lab wird zugefügt:

Milch	bei Luftzutritt exponiert	bei Luftabschl. exponiert	nicht exponiert
ungefärbt	18	15	12
mit Eosin gefärbt . .	60	35	30
mit Erythrosin gefärbt	60	35	30

VI. Versuche unter der Eosin- resp. Erythrosinglocke.

30. I. Lab ungefärbt und mit Eosin bzw. Erythrosin gefärbt, werden teils unter der Eosin- resp. Erythrosinglocke, teils direkt am Tageslichte 3 Stunden exponiert.

Lichtverhältnisse: trüb, keine Sonne.

Nicht exponierte Milch wird versetzt mit:

Lab	unter Eosin-Glocke exp.	unter Erythr.-Glocke exp.	direkt exp.	nicht exp.
ungefärbt	10	10	10	8
mit Eosin gefärbt .	15		40	10
mit Erythrosin gef.		15	40	10

10. II. Wiederholung des obigen Versuches bei Exposition 4 Stunden am Sonnenlichte.

Nicht exponierte Milch wird versetzt mit:

Lab	unter Eosin-Glocke exp.	unter Erythr.-Glocke exp.	direkt exp.	nicht exp.
ungefärbt	12	14	14	10
mit Eosin gefärbt .	Nach 120 Min. Gerinnung beg.		Nach 120 Min. k. Gerinnung	10
mit Erythrosin gef.		Nach 120 Min. Gerinnung beg.	Nach 120 Min. k. Gerinnung	10

Resümee. Aus den mitgeteilten Versuchen ist ersichtlich, dafs die Wirksamkeit einer Lablösung durch Exposition am Lichte, namentlich bei Zusatz von sensibilisierenden Farbstoffen, bedeutend abgeschwächt wird. Während z. B. eine bestimmte Lablösung, im Dunkeln aufbewahrt, die Gerinnung der Milch nach 8—10 Minuten bewirkte, war die Wirksamkeit einer am Lichte exponierten, mit Eosin oder Erythrosin gefärbten Lösung unter denselben Bedingungen um eine bis mehrere Stunden verzögert. Der Unterschied zwischen nicht gefärbter und sensibilisierter Lösung war bei der Exposition auch hier sehr deutlich, noch gröfser als zwischen der

nicht exponierten und exponierten farblosen Lablösung, während zwischen der im Dunkeln aufbewahrten ungefärbten und der gefärbten Lösung nur ein geringer Unterschied nachweisbar war.

Es wurde auch Milch der Einwirkung des Lichtes ausgesetzt, um festzustellen, ob die Gerinnungsfähigkeit derselben nach dem Lichteinflufs verändert wird. Auch hier stellte sich hieraus, dafs, währenddem die nicht exponierte gefärbte Milch ungefähr gleich rasch zur Gerinnung gebracht wurde als die nicht gefärbte, die mit Eosin resp. Erythrosin gefärbte Milch nach Exposition viel langsamer gerinnt als die sensibilisierte, nicht exponierte.

Weitere Versuche sollten feststellen, ob durch getrennte Exposition und nachherige Vermengung von Farbstoff und Lablösung der Einflufs ein ähnlicher war. Es stellte sich aber heraus, dafs die exponierte Eosinlösung auch hier nur dann wirkt, wenn sie schon während der Exposition mit dem Lab vermengt ist.

Wurde die exponierte Lablösung über Nacht aufbewahrt und erst etwa 12 Stunden nach der Exposition nochmals auf ihre Wirksamkeit geprüft, so waren die Resultate ähnlich lautend wie in den gleich nach der Exposition vorgenommenen Untersuchungen, so dafs eine nachträgliche Zunahme der Wirksamkeit einer abgeschwächten Lablösung nicht angenommen werden kann.

Der Einflufs des Luftzutrittes bei der Abschwächung der exponierten, sensibilisierten Lablösung war auch hier nachweisbar, obschon nicht so deutlich wie bei den früher beschriebenen bakteriziden Versuchen und bei denjenigen auf Virulenzschwächung.

Die Versuche unter der Eosin- und Erythrosinglocke ergaben, dafs ungefärbte Lablösungen, welche durch Eosin- oder Erythrosinlicht belichtet wurden, nicht stärker verändert werden als ungefärbte, dem direkten Lichte ausgesetzte Lösungen. Die unter Eosin- resp. Erythrosinglocke exponierten, sensibilisierten Lablösungen verhielten sich ungefähr wie die direkt exponierten gefärbten. Entsprechend der etwas schwächern Lichtintensität war auch hier die Abschwächung der Wirksamkeit eine etwas geringere.

Aus unseren Versuchen geht hervor, dafs das diffuse Tageslicht, noch mehr aber das Sonnenlicht von schädigendem Einflufs

auf Wachstum und Virulenz pathogener Mikroorganismen (Streptococcus pyogenes und Diphtheriebacillus), auf Tetanus- und Diphtherietoxin sowie deren Antitoxine und auf Labferment ist. Immerhin mufs hier hervorgehoben werden, dafs die bakterizide und die giftzerstörende Wirkung des Tages- bzw. Sonnenlichtes bei der von uns gewählten Versuchsanordnung keine so starke ist, wie häufig angenommen wird. Wiederholt konnten wir in unseren in den Monaten Januar, Februar und Mai ausgeführten Versuchen nachweisen, dafs trotz zweistündiger Exposition am Sonnenlichte Diphtheriebazillen und Streptokokken, Tetanus- und Diphtherietoxine ihre Virulenz bzw. Giftigkeit noch nicht eingebüfst hatten. In einigen Fällen konnte selbst nach 5—6 stündiger Exposition am Sonnenlicht weder die bakterientötende noch toxinzerstörende Wirkung desselben nachgewiesen werden. Viel schneller und frappanter tritt diese Wirkung ein, wenn das zu belichtende Medium vorher mit einer 1 ‰ Eosin- oder Erythrosinlösung, also einem sogenannten photodynamischen oder sensibilisierenden Farbstoffe gefärbt wird. Wie Mettler gezeigt hat, rufen auch geringere Konzentrationen dieser Farbstoffe diese Wirkung hervor, es dürfen aber nicht beliebige Farbstoffe, sondern eben nur sensibilisierende sein.

Aus weiteren Versuchen geht hervor, dafs Lichtstrahlen, welche durch Rubinglas filtriert werden, also »rotes Licht«, keine oder nur unbedeutende Wirkung auf Wachstum und Virulenz pathogener Bakterien sowie auf Antitoxine hatten und zwar selbst nach tagelanger Belichtung. Es blieb sich dabei ziemlich gleich, ob die exponierte Flüssigkeit sensibilisiert war oder nicht. Die Versuche erweitern die von Mettler angegebenen Resultate, indem trotz stärkerer Belichtung und längerer Expositionszeit pathogene Mikroorganismen nicht nur nicht abgetötet, sondern auch in ihrer Virulenz in keiner Weise verändert wurden. Wurde das Licht in Versuchen mit Lab durch eine sensibilisierende Farbstofflösung filtriert, so liefs sich in der Wirkung gegenüber dem direkten Sonnenlicht kein deutlicher Unterschied konstatieren, auch sensibilisierte Lablösungen wurden dadurch nicht mehr als gewöhnlich beeinflufst.

Was die Erklärungen der Lichtwirkung ohne und mit Sensibilisation durch die verschiedenen Autoren anbelangt, so sind dieselben in der Arbeit von Mettler berücksichtigt.

Die neuesten Untersuchungen von Bie (15) haben in Bestätigung der Ansicht von Kruse (27) ebenfalls ergeben, dafs bei der Lichtwirkung neben der Schädigung durch gebildete schädliche Stoffe wie Wasserstoffsuperoxyd die Lichtstrahlen an und für sich schädlich wirken. Was die Wirkung der von Tappeiner als photodynamische und von Dreyer als sensibilisierende bezeichneten Farbstoffe betrifft, so ist eine befriedigende Erklärung bis jetzt nicht erbracht.

Unsere Untersuchungen haben die Resultate von Mettler bestätigt, und wir können ebenfalls die Wirkung von Eosin und von Erythrosin mit Busk (28), Tappeiner und andern als eine Verstärkung der gewöhnlichen Lichtwirkung auffassen. In allen unseren Versuchen konnten wir ebensowenig wie Mettler einen qualitativen Unterschied in der Wirkung des Lichtes auf sensibilisierte und auf nicht sensibilisierte Nährböden konstatieren, sondern nur quantitative, graduelle.

Schlufsfolgerungen.

1. Die bakterizide Wirkung des Tages- bzw. des Sonnenlichtes auf Bouillonkulturen oder Aufschwemmungen von Streptococcus pyogenes und Diphtheriebazillen ist eine geringe. Die Wirkung des Lichtes wird aber bedeutend erhöht, wenn den Flüssigkeiten geringe Mengen (1‰) sensibilisierender Farbstoffe, Eosin oder Erythrosin zugesetzt werden.
2. Das Tageslicht wirkt nicht nur schädigend auf die Lebensfähigkeit, sondern auch auf die Virulenz von Bakterien. Bei unserer Versuchsanordnung war auch diese Wirkung trotz mehrstündiger Expositionszeit keine bedeutende. Wurden die exponierten Aufschwemmungen

hingegen vorher mit Eosin oder Erythrosin gefärbt, so war die virulenzschwächende Wirkung des Lichtes eine viel stärkere.

3. Keimtötende und virulenzschwächende Wirkung des Lichtes gehen Hand in Hand; immerhin konnte wiederholt beobachtet werden, dafs exponierte, sensibilisierte Kulturen nicht mehr virulent waren, obschon dieselben noch entwicklungsfähige Mikroorganismen enthielten.

4. Ähnlich wie gegenüber virulenten Kulturen war die giftzerstörende Wirkung des Tageslichtes gegenüber ungefärbtem Diphtherie- und Tetanustoxin eine beschränkte, währenddem sensibilisierte Giftlösungen in ziemlich kurzer Zeit ihre Giftigkeit für Versuchstiere einbüfsten. Die sensibilisierenden Antitoxine von Diphtherie und Tetanus verloren am Lichte ebenfalls bald ihre spezifischen Eigenschaften.

5. Labferment büfst nach mehrstündiger Exposition am Tageslicht nur wenig von seiner milchgerinnenden Eigenschaft ein; wird die Lablösung mit Eosin oder Erythrosin versetzt, so tritt nach kurzer Belichtung eine deutliche Verlangsamung der Gerinnung ein.

6. Wird das Tageslicht durch Rubinglas filtriert, so ist die bakterientötende sowohl wie die giftzerstörende Wirkung auch bei mehrtägiger Exposition kaum nachweisbar; die sensibilisierten Lösungen werden ebenso wenig beeinflufst als die nicht gefärbten. Die geringen Unterschiede lassen sich wohl auf eine auch während der Exposition im Dunkeln wahrzunehmende chemische Einwirkung des betreffenden Farbstoffes zurückführen. Das von uns geprüfte »Rote Licht« hat also weder eine bakterizide noch eine giftzerstörende Wirkung gezeigt.

7. Das durch verdünnte Eosin- bzw. Erythrosinlösungen filtrierte Licht wirkt auf ungefärbte und auf sensibilisierte Flüssigkeiten nicht intensiver als das Tageslicht; die Wirkung des unveränderten Tageslichtes

war vielmehr stets kräftiger als die Wirkung des durch einen sensibilisierenden Farbstoff filtrierten.

8. Die schädigende Wirkung des Lichtes ist viel stärker bei Luftzutritt als unter Luftabschlufs. Dies gilt auch für die mit photodynamischen Farbstoffen gefärbten Lösungen; wurden sensibilisierte Aufschwemmungen von Bakterien oder Lösungen von Labferment bei Luftabschlufs am Licht exponiert, so war die Schädigung derselben nicht stärker als in den ähnlich exponierten nicht gefärbten Lösungen.

Zum Schlusse sei es mir gestattet, Herrn Privatdozent Dr. W. Silberschmidt, Vorstand der bakteriologischen Abteilung am Hygiene-Institut für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit und für die Unterstützung bei der Ausführung derselben bestens zu danken.

Literatur.

1. Mettler, Experimentelles über die bakterizide Wirkung des Lichtes auf mit Eosin, Erythrosin und Fluoreszein gefärbte Nährböden. Dissertation, Zürich, 1905. Archiv f. Hygiene, 1905, Bd. 53.
2. Downes u. Blunt, Proceeding of the Royal Society of London, 1877, XXVI, S. 488.
3. Dieudonné, Arbeiten aus dem Kais. Gesundheitsamte, 1894, Bd. 9.
4. Finsen, Om Anvendelse i Medicinen af koncentrerede kemiske Lysstraaler. Köbenhavn, 1896.
5. Tappeiner, Münch. Med. Wochenschrift. 2. Jan. 1900. 5. Nov. 1901. Nr. 16, 1904. Deutsche Med. Wochenschrift, Nr. 16, 1904.
6. Dreyer, Mitteilungen aus Finsens med. Lichtinstitut, Heft 7, 1904.
7. Bie, Om Lisets Virkuing paa Bakterier. Köbenhavn, 1903.
8. Arloing, Comptes rendus, 1885, Vol. C—CI.
9. Duclaux, Comptes rendus, 1885, Vol. C.
10. Palermo, Ref. im Zentralblatt für Bakteriologie, 1895, Bd. 18, S. 665.
11. Chemeleswky, Ref. im Zentralblatt für Bakteriologie, 1892, Bd. 12.
12. d'Arsonval et Charrin, Comptes rendus. Acad. des Sciences, 1894.
13. Momont, Annales de l'Institut Pasteur, 1892, VI.
14. Santori, Annales de l'Inst. hyg. Roma, 1890.
15. Bie, Mitteilungen aus Finsens med. Lichtinstitut, Heft I.
16. Kitasato, Zeitschrift f. Hygiene, Bd. 10, 1890.
17. Tizzoni u. Cattani, Archiv f. experiment. Pathologie, 1890, Bd. 27.
18. Fermi u. Celli, Ref. im Zentralblatt f. Bakteriol., 1892, Bd. 12, Nr. 18.
19. Tappeiner u. Jodlbauer, Münch. med. Wochenschrift, Nr. 17, 1904.
20. Tappeiner, Berichte der d. chem. Gesellschaft, 1903, Bd. 36, S. 3035.
21. Arrhenins u. Madsen, Zeitschrift f. physik. Chemie, 1903, Bd. 44, Heft 1.
22. Downes u. Blunt, Proceeding of the Royal Society of London, Vol. 28, S. 205.
23. Fermi u. Pernoni, Zeitschrift f. Hygiene u. Infekt., 1894, Bd. 18.
24. Emmerling, Berichte der d. chem. Gesellschaft, 1901, Bd. 34.
25. Tappeiner u. Jodlbauer, Deutsches Archiv f. klin. Medizin, Bd. 80.
26. Schmidt-Nielsen, Mitteilungen aus Finsens med. Lichtinstitut, Heft 9, 1904.
27. Kruse, Zeitschrift f. Hygiene u. Infekt., Bd. 19, S. 312.
28. Busk, Mitteilungen aus Finsens med. Lichtinstitut, Heft 8, 1904.

Vernichtung der Bakterien im Wasser durch Protozoen.

Von

Dr. Otto Huntemüller
aus Hoya a. d. Weser.

(Mit Tafel I.)

Professor Emmerich und Dr. Gemünd hatten die Beobachtung gemacht, dafs sich Typhusbazillen, die in grofser Anzahl im Mangfall-Leitungswasser ausgesät waren, nach einigen Tagen darin nicht mehr durch die Kultur nachweisen liefsen, während der Nachweis in sterilem Wasser noch nach längerer Zeit gelang. Da die chemische Zusammensetzung des Wassers in beiden Fällen so ziemlich die gleiche war, konnte hierdurch das verschiedene Verhalten der Bakterien im Wasser nicht erklärt werden. In dem nicht sterilisierten Wasser fanden sich nach diesen Versuchen sehr wenig Keime, nur 8 bis 10 pro ccm, so dafs auch diese die Vernichtung der Typhusbazillen nicht verursacht haben konnten. Dagegen war in dem nicht sterilisierten Wasser eine grofse Menge Protozoen nachweisbar, während das sterilisierte natürlich frei davon war.

Aus diesen Beobachtungen glaubte Professor Emmerich die Abnahme der Typhusbakterien im Wasser auf die Tätigkeit der Protozoen zurückführen zu dürfen. Es gelang ihm auch durch die von Giemsa für die Malariaplasmodien vorgeschlagene Färbungsmethode Bazillen in den Protozoen, und zwar waren letztere Flagellaten, nachzuweisen, auch konnte er die Bakterien in verschiedenen Stadien der Auflösung im Flagellatenkörper sehen.

Auf seine Veranlassung und unter seiner gütigen Beihilfe befafste ich mich näher mit diesen Beobachtungen.

Die Versuche wurden mit den verschiedensten Wässern und, wenn nicht besonders erwähnt, in diffusem Tageslicht bei Zimmertemperatur angestellt. Die Wasserentnahme geschah in sterilem Glase, das halbgefüllt etwa 100 ccm fafste. Zum Vergleich wurde meist ein Versuch mit sterilem oder keimfrei filtriertem Wasser, d. h. Wasser, in dem keine Flagellaten waren, gemacht.

In allen Brunnen, Flüssen und Quellen, die wir untersuchten, ja selbst wenn sie erst gerade aus dem Boden herauskamen, liefsen sich Protozoen nachweisen, und zwar sind es in den reinen Wässern, z. B. dem Mangfallwasser (dem Münchener Trinkwasser) Wasser aus einem Brunnen bei Schäftlarn etc., hauptsächlich die beiden Flagellatenarten Bodo ovatus und Bodo saltans, und unter diesen wieder besonders der erste.

Mangfallwasser am 6. 5. 04 zu je 3,0, 2,0, 1,0 und 0,5 ccm in sterilisiertem Reagensglase mit einer grofsen Anzahl Typhusbazillen versetzt, enthielt am 16. 5. in allen Proben reichlich diese beiden Arten. Ja, in 0,05 ccm Mangfallwasser liefsen sich auf diese Weise Flagellaten nachweisen, während in sterilem, auf gleiche Weise beschicktem Wasser keine Flagellaten enthalten waren, so dafs also in 0,05 ccm Mangfallwasser mindestens ein Flagellat oder eine Spore vorhanden sein mufste. Auf 1 ccm Mangfallwasser treffen somit im Sommer wenigstens 20 Flagellaten.

Als Bakterienmaterial diente meist eine frische, 24 Stunden bei 37° auf Agar gewachsene Typhuskultur, doch wurden auch Versuche mit anderen Bakterien gemacht.

Alle diese Versuche ergaben dasselbe Resultat, nach 2 bis 3mal 24 Stunden waren die Typhusbazillen aus dem Wasser nahezu verschwunden, wenigstens so, dafs sie sich durch das gewöhnliche Gelatine-Plattenverfahren nicht mehr nachweisen liefsen.

Die Zahl der Flagellaten hatte dagegen ganz bedeutend zugenommen.

Sehr interessant ist auch das Verhalten der Wasserbakterien. Diese nahmen, solange die Flagellaten an den eingesäten Typhusbazillen reichlich Nahrung fanden, beständig zu, doch vom dritten Tage an wieder stetig ab und waren am vierten Tage bedeutend weniger vorhanden als bei Beginn des Versuchs, da sie den stark vermehrten Flagellaten jetzt leichter zur Beute fielen.

Versuch vom 6. V. 1904.

a) Das Wasser aus dem Brunnen des hygienischen Instituts hatte am 6. V. eine Keimzahl von 6930 pro 0,05 ccm (gezählt nach 48 Stunden), also in 1 ccm 138 600 Wasserbakterien und eine ziemliche Menge von Flagellaten, Infusorien und anderen Protozoen.

Von diesem Wasser werden 100 ccm mit einer Öse einer frischen Typhusagarkultur versetzt und wiederholt umgeschüttelt, um das Bakterienmaterial gut zu verteilen. Davon wird sofort eine Öse, die etwa 0,005 ccm faſst, zu einer Gelatineplatte ausgegossen. Diese Platte, die 24 Stunden bei 22° im Wärmeschrank gestanden hat, ergibt am:

7. V. . . .	176 400	Kolonien pro Platte
nach 24 Std.	20 070	» » »
» 2×24 »	360	» » »

Unter diesen 360 Kolonien waren nur noch einige wenige, welche typhusbazillenverdächtiges Aussehen hatten.

b) am 7. V. wird der Versuch mit Wasser aus dem Brunnen des hygienischen Instituts wiederholt, nach Zusatz einer Öse einer 24 Stunden bei 36° gewachsenen Typhusagarkultur und kräftigem Umschütteln werden drei Ösen des infizierten Wassers zu einer Gelatineplatte ausgegossen, auf dieser wachsen in 24 Stunden bei 22° im

Warmeschrank	214 200	Kolonien
aus 3 Ösen nach 24 Std.	20 340	»
» 5 » » 48 »	7 200	»

Eine Identifizierung der wenigen, nach 48 Stunden vorhandenen typhusbazillenähnlichen Kolonien wurde nicht ausgeführt.

Versuch vom 12. V. 1904.

Wasser aus einem Brunnen in der Nähe des Bavariadenkmals enthält in 0,01 ccm 2700 Wasserbakterien. Zu 100 ccm werden drei Ösen einer frischen Typhusagarkultur gesetzt und hiervon nach mehrmaligem Umschütteln fünf Ösen à 0,005 ccm zu einer Gelatineplatte ausgegossen. Es wachsen auf der wie im vorigen Versuch

behandelten Platte	261 000	Kolonien
aus 5 Ösen nach 20 Std.	195 300	»
» 5 » » 46 »	135 000	»
» 5 » » 68 »	8 280	»

darunter sehr wenig typhusbazillenähnliche Kolonien.

Versuch vom 19. V. 1904.

Münchener Leitungswasser (Mangfallwasser) enthält am 19. V. in 1 ccm 4 Kolonien des Bac. fluorescens liquefaciens. Hiervon werden 100 ccm mit drei Ösen einer frischen Typhusagarkultur versetzt und nach gutem Umschütteln drei Ösen zu einer Platte ausgegossen. Es ergeben sich

sofort	151 200	Kolonien
aus 3 Ösen nach 24 Std.	56 700	»
» 3 » » 48 »	16 200	»

Werden von diesen letzteren alle verdächtigen Kolonien als Typhusbazillen gezählt, so ergeben sich 2430 Typhusbazillenkolonien.

Waren in einem Wasser schon an und für sich viele Flagellaten enthalten, so läfst sich schon nach einer Stunde eine deutliche Abnahme der eingesäten Typhusbazillen konstatieren, während Typhusbazillen im sterilen Wasser nach dieser kurzen Zeit sogar öfters etwas zugenommen hatten. Dies letztere erklärt sich daraus, dafs viele Bakterien der Agarkultur in Teilung begriffen waren, als sie ins Wasser verimpft wurden, in welchem sich alsdann die Teilung in der ersten Stunde noch vollständig vollzog. Stellte man nämlich eine starke Suspension von Typhusbazillen in einigen Kubikzentimetern sterilen Wassers her, liefs diese etwa 1 Stunde stehen und verimpfte hiervon, so fand keine Vermehrung statt.

Versuche vom 20. VI. 1904.

a) Wasser aus dem Brunnen des hygienischen Instituts wird mit einer Öse einer frischen Typhusagarkultur versetzt. Die aus drei Ösen gegossene Platte ergibt

sofort	199 350	Kolonien
nach 1 Std.	148 680	»

b) Ein am selben Tage wiederholter zweiter Versuch ergibt aus drei Ösen

sofort	124 830	Kolonien
nach 1 Std.	81 900	»

Versuche vom 21. VI. 1904.

a) Wasser aus dem Brunnen des hygienischen Instituts, auf dieselbe Weise wie in den vorigen Versuchen mit Typhuskeimen versetzt, ergibt aus drei Ösen

sofort	241 650	Kolonien
nach 1 Std.	140 598	»

pro Platte.

b) Im strömenden Dampf sterilisiertes Wasser aus dem Brunnen des Instituts wird gleichfalls mit Typhusbazillen versetzt und enthält in drei Ösen

sofort	134 900	Typhuskeime
nach 1 Std.	201 600	»

Versuch vom 22. VI. 1904.

a) 100 ccm Wasser aus dem Instituts-Brunnen wird mit fünf Ösen einer Aufschwemmung in 2 ccm sterilem Wassers einer frischen Agartyphusbazillenkultur versetzt, die eine Stunde lang gestanden hat. Aus drei Ösen ergeben sich

sofort	64 350	Kolonien
nach 1 Std.	43 497	»

b) 100 ccm sterilisiertes Wasser aus dem Institutsbrunnen wie bei a) behandelt ergibt

sofort	50 103	Typhuskolonien
nach 1 Std.	52 875	»
» 48 »	11 700	»
» 11 × 24 Std.	387	»

Der folgende Versuch zeigt, dafs auch die Wasserbakterien ebenso schnell wie die Typhusbazillen von den Protozoen gefressen werden.

Am 22. VI. werden zu Wasser aus dem Institutsbrunnen drei Ösen einer frischen, 24 Stunden bei 37° auf Agar gewachsenen Kultur des Bacillus fluorescens liquefaciens gesetzt und hiervon drei Ösen zu einer Gelatineplatte ausgegossen; man erhält auf der Platte

sofort	352 000	Kolonien
nach 1 Std.	264 600	»
» 24 »	11 160	»

Versuch vom 29. VI. 1904.

Aus dem Institutsbrunnen werden drei Ösen in ein Bouillonröhrchen verimpft und dieses 24 Stunden bei 37° im Wärmeschrank stehen lassen. Von dieser Bouillonkultur, in der sich die Wasserbakterien während dieser Zeit sehr reichlich vermehrt hatten, werden drei Ösen zu ca. 100 cbm Wasser aus dem Brunnen des hygienischen Instituts gesetzt. Auf der sofort nach der Einsaat aus 3 Ösen gegossenen Gelatineplatte wachsen

sofort	260 380	Kolonien
nach 1 Std.	236 394	»
» 24 »	24 930	»
» 48 »	2 160	»

Die Temperatur spielt bei der Vernichtung der Bakterien auch eine Rolle; nach meinen bisherigen Versuchen scheint

26—30° C das Optimum für die Entwicklung und Frefstätigkeit der Protozoen zu sein. Auch das Licht scheint einen Einflufs hierbei auszuüben, doch sind die Versuche hierüber noch nicht abgeschlossen.

Versuch vom 24. VI. 1904.

a) Wasser aus dem Institutsbrunnen wird mit einer frischen Typhuskultur versetzt und bei 26° C im Wärmeschrank gehalten.

Aus drei Ösen wachsen

sofort	428 400 Kolonien	gezählt nach 48 Std.
nach 1 Std.	340 000 ›	
› 24 ›	79 200 ›	

nach 48 Stunden Platte fast steril, Typhusbazillen nicht mehr nachweisbar.

b) Steriles Wasser aus dem Institutsbrunnen wie, bei a behandelt, ergibt aus drei Ösen

sofort	315 000 Kolonien	gezählt nach 48 Std.
nach 1 Std.	331 794 ›	
› 24 ›	235 980 ›	
› 4 × 24 Std. . . .	10 845 ›	
› 14 × 24 › . . .	840 ›	

nach 20 × 24 Stunden Platte steril.

Während die Abnahme der Bakterien nach 1 Stunde sehr beträchtlich ist, ist sie nach der zweiten Stunde nur gering. Dies erklärt sich daraus, dafs die Flagellaten sich in der ersten Stunde vollgefressen haben und in der zweiten Stunde verdauen, wie ich dies wiederholt unter dem Mikroskop beobachten konnte.

Versuch vom 26. VI. 1904.

a) Mit Typhuskeimen versetztes Wasser aus dem Institutsbrunnen wird bei 30° C im Wärmeschrank gehalten; aus drei Ösen wachsen

sofort	153 775 Kolonien	gezählt nach 48 Std.
nach 1 Std.	102 960 ›	
› 2 ›	104 994 ›	
› 4 ›	87 957 ›	
› 24 ›	33 930 ›	

nach 48 Stunden Platte bleibt fast steril.

b) Derselbe Versuch mit sterilisiertem Wasser aus dem Institutsbrunnen aus drei Ösen

sofort	195 075 Kolonien	gezählt nach 48 Std.
nach 1 Std.	203 180 ›	
› 24 ›	128 180 ›	
› 2 × 24 Std. . . .	108 420 ›	
› 4 × 24 › . . .	59 580 ›	
› 13 × 24 › . . .	2 970 ›	

nach 19 × 24 Stunden Platte fast steril, nach 23 × 24 Stunden werden 10 Ösen in Bouillon übertragen; bei 37° C im Wärmeschrank entwickeln sich Typhusbazillen.

Verimpft man eine geringere Zahl Typhuskeime ins Wasser, so nehmen auch die Flagellaten nicht in dem Mafse zu, als wie bei gröfserer Aussaat, auch spielt hierbei die Menge der schon vor dem Versuch im Wasser befindlichen Flagellaten eine Rolle; da die Bazillen bei der geringen Anzahl der Flagellaten den Nachstellungen derselben eher entgehen, so können sie sich auch länger im Wasser erhalten.

Am 7. VII. wird zu Mangfallwasser eine Öse einer Aufschwemmung einer frischen Typhusbazillenkultur in steriles Wasser gesetzt. Auf der sofort aus 3 Ösen gegossenen Gelatineplatte wachsen 45000 Kolonien. Die Anzahl der Flagellaten ist nach 24 Stunden nicht sehr beträchtlich vermehrt. Am 17. VII. werden 10 Ösen in ein Bouillonröhrchen verimpft und dies 14 Stunden bei 37° C im Wärmeschrank gehalten. Von dieser Bouillonkultur werden 3 Ösen zu 3 Gelatineplatten verarbeitet. Auf Platte 3. wachsen neben vielen Wasserbakterien auch einige Typhuskolonien, die in Bouillon überimpft und nach 24stündigem Wachstum bei 37° C durch die Agglutination als Typhus erwiesen werden.

Ebenso liefsen sich in einem zweiten, am gleichen Tage mit Mangfallwasser angestellten Versuch, der nach der Einsaat 35010 Kolonien in 3 Ösen enthielt, nach 10 Tagen Typhusbazillen durch die Agglutination nachweisen.

Aus zwei anderen Proben, die am 11. VII. mit einer grofsen Anzahl Typhuskeime versetzt wurden, und von denen die eine in 3 Ösen sofort nach der Aussaat 225000, die andere 405000 Keime enthielt, liefsen sich auf die oben angeführte Weise nach 6 Tagen Typhusbazillen durch die Agglutination nachweisen.

Alle diese Versuche geben dasselbe Resultat; die in grofser Zahl ins Wasser verimpften Typhuskeime werden durch die Protozoen in wenigen Tagen vernichtet oder wenigstens so dezimiert, dafs sie nur noch schwer im Wasser nachzuweisen sind. Die Flagellaten haben sich während dieser Zeit ganz

bedeutend vermehrt und nehmen erst allmählich wieder bis auf ihren früheren Bestand ab. Über ihre Zahl genaue Angaben zu machen, ist jedoch nicht möglich.

Im zweiten Hefte des 52. Bandes des Archiv für Hygiene, S. 208, veröffentlicht Dr. W. Hoffmann Untersuchungen aus dem hygienischen Institut zu Berlin: über die Lebensdauer der Typhusbazillen im Aquariumwasser, welche im wesentlichen dieselben Resultate ergaben wie die meinigen.

Am 10. November 1904 hatte er eine Typhusaufschwemmung in ein Aquarium gegossen. Gleich nach der Aussaat fanden sich 336 416 Typhuskeime pro 1 ccm Aquariumwasser mit 59 590 Wasserkeimen. Am 13. Mai, also nach etwa dreimal 24 Stunden, wurden von der Oberfläche des Wassers an verschiedenen Stellen 4 Ösen entnommen und auf Drigalski-Conradi-Platten ausgestrichen. Hieraus wuchsen bis zum nächsten Tage zwei verdächtige Kolonien, von denen nur die eine durch die Agglutination als Typhuskolonie festgestellt wurde. Nehmen wir an, dafs die Öse, wie die unsere, etwa 0,005 ccm fafste, so fand sich also in 0,02 ccm nach dreimal 24 Stunden ein Keim, in 1 ccm 50 Keime. Also hatten die Typhusbazillen nach diesem Versuche innerhalb dreimal 24 Stunden in einem Kubikzentimeter von 336 416 auf 50 abgenommen. Am 18. Mai, also nach fünfmal 24 Stunden, liefsen sich auf diese Weise keine Typhuskeime mehr nachweisen. Auch die Wasserbakterien hatten am 31. Mai von anfangs 59 590 auf 900 abgenommen und betrugen am 11. Juli 1518 pro ccm. Ein Befund, der mit dem meinen gleichfalls übereinstimmt.

Hätte Herr Dr. Hoffmann auch dem Verhalten der Protozoen Beachtung geschenkt, so würde er ihre Zahl in den ersten Tagen, solange sie reichlicheres Futter hatten, bedeutend vermehrt gefunden haben, alsdann wären sie erst allmählich zu ihrem alten Bestande bei Beginn des Versuchs wieder herabgesunken. Er würde also auch in diesem Punkte zu demselben Resultat gekommen sein wie ich:

Dafs sich durch das Anreicherungsverfahren am 19. Mai aus 45 ccm Aquariumwasser und am 7. Juni aus 90 ccm noch Typhusbazillen nachweisen liefsen, ist nichts Ungewöhnliches und

stimmt auch mit meinen Beobachtungen überein. Siehe Versuche vom 7. und 11. Juli.

Ob aber die Typhuskeime in dieser Verdünnung eine Infektion veranlassen können, das erscheint mir sehr zweifelhaft, zumal auch die Selbstinfektionsversuche von v. Pettenkofer und Emmerich dafür sprechen, dafs Infektionen vom Intestinaltraktus aus in der Regel nur durch Zufuhr gröfserer Mengen pathogener Bakterien zustande kommen.

Wenn aus den obigen Versuchen schon hervorgeht, dafs die Abnahme der Typhuskeime im Wasser durch die Tätigkeit der Protozoen bedingt ist, so wird dies durch die mikroskopische Untersuchung aufser allen Zweifel gestellt.

Da bei Trockenpräparaten der Protozoenkörper nicht intakt bleibt, und nicht die verschiedenen Stadien der Bakterienaufnahme und Verdauung sich verfolgen lassen, so versuchte ich, die Beobachtungen an lebenden Protozoen zu machen. Das Präparat im hängenden Tropfen war hierzu nicht brauchbar, da die tiefer liegenden Schichten, in denen sich die Protozoen meist aufhielten, unter dem Mikroskop bei starker Vergröfserung nicht einzustellen waren und die schnell beweglichen Protozoen leicht aus der eingestellten Ebene verschwanden. Ich versah daher ein Deckgläschen an den vier Ecken mit kleinen Wachsfüfsen, wie es bei zoologischen Untersuchungen üblich ist, deckte dieses über den auf dem Objektträger befindlichen protozoenhaltigen Wassertropfen und konnte durch Abschmelzen der Wachsfüfschen mit einem erwärmten Glasstabe oder einer Platinöse den Tropfen in einer ganz dünnen Schicht ausbreiten, ohne dafs die Protozoen hierdurch beschädigt wurden. Sie schwammen sehr lebhaft im Präparat umher und konnten jetzt auch bei starker Vergröfserung unter dem Mikroskop bequem beobachtet werden. Zeifs' homogene Immersion:

Brennweite	3,0	mm
Kompensationsokular	12	»
Tubuslänge	160	»

Diese Methode hatte aber noch weitere Vorteile. Der Sauerstoff der Luft hatte zum Tropfen stets Zutritt, das verdunstete

Wasser läſst sich leicht ersetzen, und der Zusatz der Bakterien konnte bequem zu jeder Zeit erfolgen, so daſs man den Vorgang bei ihrer Vernichtung durch die Protozoen von Anfang an beobachten konnte.

Das Protozoenmaterial war unschwer zu erhalten. Zu einigen Kubikzentimetern eines an Protozoen reichen Wassers setzte ich im Reagenzglase so viel frische Typhuskeime, bis eine deutliche Trübung auftrat, wartete nun einige Tage, bis diese Trübung wieder verschwunden war und hatte jetzt in dem Wasser eine groſse Zahl von Flagellaten und Infusorien. Aus Mangfallwasser konnte ich auf diese Weise nur die beiden Flagellatenarten, Bodo ovatus und Bodo saltans (bestimmt von Herrn Dr. Doflein) züchten. Im Wasser aus der Ruhr, das acht Monate lang gestanden hatte, in welchem sich mikroskopisch keine Protozoen mehr auffinden lieſsen, konnte man nach Einsaat von Typhusbazillen eine reichliche Menge von Protozoen nachweisen. Beim Wasser aus dem Brunnen des hygienischen Instituts, das seit dem 23. Juli 1904 im Dunkeln gestanden und in dem sich die Flagellaten auf Zusatz von Typhusbazillen reichlich vermehrt hatten, fanden sich am 17. Februar dieses Jahres bei mikroskopischer Untersuchung keine beweglichen Flagellaten, dagegen viele Sporen, die sich unter dem Mikroskop auf Zusatz von Typhusbazillen zu Flagellaten entwickelten.

Nach einigen Tagen, während welcher Zeit die Probe am Lichte gestanden hatte, lieſsen sich in dem Wasser auch ohne Bakterienzusatz Protozoen nachweisen, doch waren diese sehr wenig beweglich und nicht gröſser als die Sporen, hatten aber deutliche Geiſseln und kontraktile Vakuolen. Auf Zusatz von Typhusbazillen wurden die Bewegungen sofort lebhafter und nach einiger Zeit hatten sie die gewöhnliche Gröſse der Flagellaten erlangt.

Da die Beobachtung des ungefärbten Präparates schwierig war, obwohl ich schon hier sehen konnte, wie die Bakterien von den Flagellaten aufgenommen wurden, so suchte ich durch verschiedene Färbungen diese Schwierigkeit zu heben, doch die Protozoen wurden durch die Farbstoffe, selbst in geringer Konzentration, getötet. Ich versuchte daher, die Bakterien zu färben, und es gelang mir, ein

Verfahren zu finden, bei welchem die Eigenbewegung der Bakterien nicht beeinträchtigt wurde. Eine Öse Agarkultur von Typhusbazillen mit lebhafter Eigenbewegung wird auf einen Objektträger gebracht, und hierzu, ohne das Material weiter zu verreiben, ein Tropfen einer starken, wäfsrigen Methylenblaulösung gesetzt. Den Farbstoff lasse ich unter leichtem Erwärmen über der Flamme etwa 10 Minuten einwirken; damit die Bazillen nicht eintrocknen, setze ich mit der Platinöse ein oder zwei Wassertropfen hinzu und rühre zugleich gut um. Dann übertrage ich die mit gefärbtem Bakterienmaterial beladene Öse in einen zweiten Tropfen und von da in einen dritten etc., bis sich der letzte Tropfen nur mehr schwach blau färbt. Dieser enthält dann noch eine genügend grofse Menge Typhuskeime, die man ruhig dem die Protozoen enthaltenden Präparat zusetzen kann, ohne befürchten zu müssen, dafs diese absterben. Die Protozoen verhalten sich beim Ergreifen der Bakterien verschieden. Einige Arten, wie namentlich Bodo saltans, erjagen ihre Beute im Herumschwärmen und eignen sich daher nicht so gut zur Beobachtung. Der Bodo ovatus liegt meist während der Frefs- und Verdauungsperiode still, und man kann an ihm daher diese Vorgänge sehr gut und fortdauernd beobachten.

Die folgenden Untersuchungen sind am Bodo ovatus gemacht, der sich in jedem von uns untersuchten Wasser fand und auf Bakterienzusatz besonders stark vermehrte. Gleich nach dem Zusatz werden die nach der vorhin angegebenen Methode gefärbten Typhusbazillen durch die Geifseln des Flagellats herbeigestrudelt. Nach wenigen Minuten sieht man, wie ein Bazillus von dem Protoplasma umflossen wird und sich jetzt am Rande desselben in einer Nahrungsvakuole befindet. Bald folgt ihm ein zweiter und sofort. Bei reichlichem Bakterienzusatz kann man nach einer halben bis ganzen Stunde den Flagellaten mit Bazillen ganz vollgefressen sehen. Dieser hört jetzt mit der Bakterienaufnahme für eine längere Zeit auf und liegt ruhig, er verdaut. Erst nach etwa einer halben Stunde kommt wieder mehr Bewegung in ihn, er streckt sich in die Länge, um dann, nachdem er seine alte Gestalt wieder angenommen hat,

im Wasser umher zu schwimmen. Von da ab ist die weitere Beobachtung schwierig.

Den Verdauungsvorgang beobachtet man am besten, wenn man eine geringere Bakterienzahl zugesetzt hat, alsdann kann man die verschiedenen Stadien von der Aufnahme bis zur völligen Auflösung der Bakterien verfolgen. Zuerst sieht man den Bazillus, wie schon oben gesagt, am Rande des Flagellatenkörpers in einer Nahrungsvakuole in heftiger Bewegung. Er sucht aus dem ihn umschliefsenden Protoplasma wieder los zu kommen, und manchmal gelingt es ihm auch, besonders wenn die Flagellaten durch längeres Verweilen im Präparat nicht mehr so lebensfähig sind. Meist jedoch rückt die Vakuole mit dem Bazillus mehr in die Mitte des Protoplasmas vor und vereinigt sich mit anderen, die auch noch bewegliche Bakterien enthalten. Die Bewegungen derselben dauern noch zehn Minuten an, werden allmählich schwächer und hören dann ganz auf; jetzt beginnen die eingeschlossenen Bakterien nach und nach zu zerfallen, die Zerfallprodukte fliefsen zusammen und nach einiger Zeit sind auch die letzten Reste von ihnen verschwunden. Auch das Methylenblau scheint chemisch verändert zu werden, denn die Flagellaten, die mit blaugefärbten Bakterien förmlich vollgepfropft waren, haben nach der Verdauung derselben ihr ursprüngliches Aussehen wieder bekommen und sind nicht blau gefärbt. Diese Beobachtungen kann man, wenn man das verdunstete Wasser des Präparats von Zeit zu Zeit durch frisches ersetzt, längere Zeit ausdehnen (man setzt am besten von dem Protozoen haltenden Wasser zu, da man auf diese Weise wieder neue lebenskräftige Individuen im Präparat bekommt).

Durch diese Versuche und mikroskopische Befunde ist es wohl über allen Zweifel festgestellt, dafs die Vernichtung der Typhuskeime im Wasser nicht durch das Überwuchern und die Konkurrenz der Wasserbakterien, sondern hauptsächlich auf die Tätigkeit der Protozoen zurückzuführen ist.

Ob und welchen Einflufs hierbei Licht und Osmose ausüben, soll noch näher untersucht werden.

Über den Gewichtsverlust des Fischfleisches beim Dünsten.

Von

Dr. **Friedrich Peters,**
Assistenten des Institutes.

(Aus den Hygienischen Instituten der Universität Berlin. Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. M. Rubner.)

Die meisten uns vorliegenden Analysen von Nahrungsmitteln betreffen die Zusammensetzung der Rohmaterialien. Von diesen Angaben ausgehend, schliefst man bei diätetischen Mafsnahmen und Untersuchungen auf dem Gebiete der Ernährungslehre dann zumeist auf die Zusammensetzung und den Wert der zugeführten Nahrung. Doch genügt, wie Rubner in seiner Physiologie der Nahrung und Ernährung[1]) betont, die Betrachtung der Rohmaterialien nicht als Basis für die Ernährungslehre, denn die Nahrungsmittel werden bei ihrer Zubereitung mehr oder minder verändert. Der Faktor, welcher dabei fast stets in Anwendung kommt, ist das Erwärmen; den Einflufs desselben hat Rubner nach verschiedenen Richtungen teils selbst, teils durch seine Schüler untersucht. So fand Nothwang[2]), dafs bei der durch die Wärme hervorgerufenen Veränderung aus dem Fleische neben dem Wasser und Salzen Extraktivstoff und etwas Eiweifs austritt. Den so eintretenden Eiweifsverlust studierte weiterhin eingehender für verschiedene Fleischarten von Säugetieren Ferrati[3]).

1) v. Leyden, Handbuch, 2. Aufl., I.
2) Dieses Archiv, Bd. XVIII, S. 80.
3) Dieses Archiv, Bd. XIX, S. 317.

Da nun schon nach den alltäglichen Erfahrungen in der Küche Fischfleisch sich beim Erwärmen hinsichtlich der Gewichtsabnahme etwas anders zu verhalten scheint als Rindfleisch oder das Fleisch von anderen Säugetieren, so forderte mein hochverehrter Chef, Herr Geheimrat Rubner, mich auf, die Gewichtsabnahme von Fischfleisch zu studieren. Für die Anregung zu diesen Untersuchungen spreche ich ihm an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank aus.

Die Gewichtsabnahme interessiert uns nicht so sehr hinsichtlich der Qualität, als vielmehr wegen der Quantität, und zwar aus folgendem Grunde: Was verloren geht, ist gröfstenteils Wasser, welches durch die bei der Koagulation des Eiweifses eintretende Schrumpfung unter beträchtlichem Drucke ausgeprefst wird; die zurückbleibende Masse wird also reicher an Trockensubstanz. Je reicher so das Fleisch an Trockensubstanz wird, desto mehr geronnenes Eiweifs wird sich in dem Fleische finden und desto zahlreicher die in einem bestimmten Volumen enthaltenen Muskelfibrillen sein. Sie werden enger aneinander gerückt sein und zugleich zäher, so dafs der den Kauwerkzeugen sich entgegenstellende Widerstand erhöht ist. Die Kaubarkeit hat aber auch zweifellos einen bestimmenden Einflufs auf die Schmackhaftigkeit einer Fleischsorte. Freilich hängt dieselbe noch von anderen Faktoren ab, aber die Gewichtsabnahme gibt uns doch einen Mafsstab. Und auch ein zweiter Punkt ist zu berücksichtigen. Wir können wohl annehmen, dafs Speisen, die den Kauwerkzeugen keine so grofse Arbeitsleistung auferlegen, besser zerkleinert werden; es wird daher bei ihnen weniger leicht die Gefahr eintreten, dafs gröbere Stücke in den Darmkanal gelangen, die dann nicht verdaut werden. Also auch die Ausnutzung wird in Beziehung treten können zu der Gewichtsabnahme. Allerdings ist auch die Ausnutzbarkeit wieder von so vielen Verhältnissen[1]) beeinflufst, dafs uns die Gewichtsabnahme nur einen Fingerzeig geben kann.

---

1) Rubner in v. Leyden, Handbuch, 2. Aufl., I, S. 118.

Bei meinen Untersuchungen ging ich in folgender Weise vor:

Die Fische, ausgenommen der Lachs, wurden lebend ins Institut gebracht, getötet und sofort verarbeitet. Nachdem sie zunächst abgeschuppt waren, wurden aus dem Rückenmuskel Stückchen von dem in der Tabelle angegebenen Gewichte, die frei von Gräten, Schuppen und Muskelhaut waren, herausgeschnitten, zwischen zwei Uhrschalen gewogen, und die einen sofort getrocknet, die anderen gedünstet.

Die dazu bestimmten Stückchen wurden sofort nach dem Wägen in hohe Bechergläser gebracht, welche mit einem Kork luftdicht verschlossen waren. Der Kork war durchbohrt von einem Draht, der ausgebogen war in einen Haken, an dem das Fleischstückchen hing, und ein kleines korbartiges Geflecht. Diese Vorsicht mufs man bei Fischfleisch gebrauchen, da es bisweilen durchschneidet. Die Gläser mit den Fleischstücken kamen in den Dampftopf und wurden von dem Zeitpunkte, wo das Thermometer 98,5° C zeigte, eine Stunde daringelassen. Nach dem Abkühlen wurden die Stückchen gewogen und ebenfalls getrocknet. Die Trockenbestimmung des Fleisches geschah in der üblichen Weise im Dampfwassertrockenschrank bis zur Gewichtskonstanz.

Bei einer Reihe von Fischstückchen wurde eine Fettbestimmung angeschlossen, die im Soxhletschen Extraktionsapparate vorgenommen wurde. Nach einer erstmaligen Extraktion wurde das Material weiter zerkleinert und zerrieben und nochmals extrahiert bis zur Gewichtskonstanz des Ätherextraktes. Die Bestimmung des Fettes mufs ausgeführt werden, denn wir müssen annehmen, dafs die Gewichtsabnahme von der Menge des koagulierenden Eiweifses abhängt; ein höherer Fettgehalt könnte daher durch das relative Zurückdrängen des Eiweifses das Endresultat in dem Sinne beeinflussen, dafs fettes Fleisch im Verhältnis zu seiner Masse durch die Hitze nur wenig an Gewicht verliert, mageres aber weit mehr. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dafs nach Rubners[1]) Erfahrungen fettes Fleisch die Wärme weniger gut

1) v. Leyden, Handbuch, 2. Aufl., I, S. 88.

leitet; dieselbe könnte in fettes Fleisch also weniger durchdringen, so dafs zu einer bestimmten Zeit noch nicht alle Eiweifsstoffe geronnen wären, denn, wie Milroy[1]) im hiesigen Institute gezeigt hat, nimmt die Menge des koagulierten Eiweifses mit der Temperatur zu.

Die Resultate meiner Untersuchungen habe ich in folgender Tabelle zusammengestellt:

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
	Fischsorte	Gewicht der		Verlust beim Dünsten	Trockensubstanz			Ätherextrakt		
		frisch. Subst.	gedünst. Subst.		Gewicht	berechn. auf frisch. Subst.	berechn. auf gedünst. Subst.	Gewicht	berechnet auf frisch. Subst.	berechnet auf gedünst. Subst.
		g	g	%	g	%	%	g	%	%
1	Sommerkarpfen I	26,06	18,49	29,05	4,40	16,88	23,80	—	—	—
2	»	22,89	16,29	28,83	3,90	17,04	23,94	—	—	—
3	»	18,76	—	—	3,49	18,60	—	—	—	—
4	Sommerkarpfen II	20,47	13,37	34,69	3,36	16,41	25,11	—	—	—
5	»	16,61	10,93	34,20	2,77	16,68	25,34	—	—	—
6	»	22,10	—	—	4,09	18,51	—	—	—	—
7	Karpfen I	17,33	—	—	3,65	21,06	—	—	—	—
8	»	26,00	16,66	35,92	4,89	18,81	29,35	—	—	—
9	»	23,66	14,95	36,81	4,66	19,70	31,17	—	—	—
10	Karpfen II	16,69	—	—	3,10	18,57	—	—	—	—
11	»	15,75	11,92	24,32	2,68	17,02	22,48	—	—	—
12	»	15,40	11,76	23,64	2,65	17,21	22,53	—	—	—
13	Karpfen III	12,68	—	—	2,48	19,56	—	0,085	0,67	—
14	»	14,64	10,77	26,43	2,69	18,37	24,98	0,032	0,22	0,30
15	Schlei	12,17	—	—	2,32	19,06	—	0,041	0,34	—
16	»	12,84	9,08	29,28	2,27	17,68	25,0	0,020	0,16	0,22
17	Lachs	20,25	—	—	6,86	33,88	—	2,622	12,95	—
18	»	31,84	22,65	28,86	10,34	32,48	45,65	4,281	13,45	18,90

Aus der Tabelle ersehen wir, dafs der Gewichtsverlust beim Dünsten ziemlich beträchtliche Schwankungen aufweist, nicht bei den einzelnen Individuen, wohl aber in derselben Art, wie z. B. der Vergleich der bei Karpfen I und Karpfen II erhaltenen Werte zeigt. Der Durchschnittswert beträgt 30,18%. Dement-

1) Dieses Archiv, Bd. XXV, S. 156.

sprechend nimmt der Trockengehalt zu, wie die Betrachtung des Stabes 8 einerseits, der Werte für die nicht gedünsteten Fische aus Stabe 7 anderseits erkennen läfst. Was zu Verlust geht, ist hauptsächlich Wasser, denn wenn wir die Werte aus der Kolumne 7 ansehen, zeigt sich, dafs der auf die Trockensubstanz entfallende Anteil an dem Verlust die Höhe von 2% nicht erreicht. Das, was von der Trockensubstanz verloren geht, besteht zu einem Teil aus den in Äther löslichen Stoffen, wie wir aus dem Stabe 10 der Tabelle sehen: so bei den fettarmen Fischen, während bei dem Lachse dies nicht der Fall ist.

Einen Einflufs des Fettgehaltes auf die Gröfse der Gewichtsabnahme lassen unsere Ergebnisse ebensowenig erkennen, wie die von Ferrati[1]).

Vergleichen wir nun unseren für die Gewichtsabnahme von Fischfleisch beim Dünsten erhaltenen Durchschnittswert von 30,18% mit den von Ferrati gewonnenen Werten, der für Rindfleisch 47,3%, für Kalbfleisch 47,3% und für Schweinefleisch 43,1% fand, so sehen wir unsere ursprüngliche Annahme bestätigt, dafs das Fischfleisch sich weniger stark zusammenzieht wie das Fleisch von Säugetieren.

Betrachten wir nun die Vorteile, welche nach unserer obigen Auseinandersetzung aus der geringeren Gewichtsabnahme folgen, so sehen wir, dafs die Ausnutzbarkeit unserer Annahme nicht widerspricht, denn Rubner[2]) gibt an, dafs von der Trockensubstanz nicht resorbiert werden in Prozenten bei gebratenem Fleisch 5,3, bei gekochtem und gebratenem Fleisch 4,9 und bei Schellfischfleisch 4,3. Bei der Schmackhaftigkeit liegt die Sache anders, da eben das Fischfleisch weit weniger schmeckende Bestandteile besitzt wie das von Säugetieren, und dadurch der Vorzug aus der leichteren Kaubarkeit verwischt wird. Jedenfalls aber geben uns unsere Resultate das Recht, Fischfleisch in allen den Fällen zu empfehlen, wo die Kauwerkzeuge möglichst geschont werden sollen, so bei Rekonvaleszenten u. a., zumal hinsichtlich des Eiweifsgehaltes das Fischfleisch sich ähnlich

1) a. a. O.

2) v. Leyden, Handbuch, 2. Aufl., I, S. 119.

verhält wie das Warmblüterfleisch (Rubner[1]). Auch müssen wir auf Grund unserer Resultate die Bestrebungen nur billigen, die darauf hinausgehen, dem Fischfleisch als Volksnahrungsmittel weiterhin Eingang zu verschaffen.

Ich habe zu Anfang bemerkt, dafs die meisten Nahrungsmittelanalysen nur auf die Rohmaterialien Bezug nehmen und möchte deshalb auf eine Arbeit von Schwenkenbecher[2]) hinweisen, der in derselben die bereits vorhandenen und ferner eigene Analysen tischfertiger Speisen zusammengestellt hat.

---

1) v. Leyden, Handbuch, 2. Aufl., I, S. 87.

2) Inaug.-Dissert., Marburg, 1900.

Aus dem hygienisch-bakteriolog. Laboratorium des Eidgen. Polytechnikums.
(Vorstand: Prof. Dr. O. Roth.)

Studien über verdorbene Gemüsekonserven.

Von

Dr. Joseph Belser,
dipl. Chemiker.

Die meisten Gemüsearten sind bei uns nur während einer verhältnismäfsig kurzen Zeit des Jahres, in den Sommermonaten, frisch zu erhalten. Daher ist man seit frühester Zeit bemüht gewesen, durch geeignete Konservierungs-Verfahren diese Ungleichheit der Produktion, diesen zeitlichen Überflufs und wiederkehrenden Mangel zu beheben. Aus wenig bevölkerten Gegenden lassen sich derart Nahrungsmittel in dicht bevölkerte Kulturstaaten, namentlich in grofse Städte schaffen, ohne dafs man ein Verderben derselben zu befürchten hat. Durch die Entwicklung der Konservenindustrie hat die gesamte Ernährungsfrage eine wichtige Förderung erfahren.

Zum Eintreten von Fäulnis sind drei Bedingungen erforderlich, nämlich[1]):

1. Hinreichende Feuchtigkeit.
2. Genügende Wärme.
3. Gegenwart von Mikroben oder durch solche erzeugte Fermentkörper.

---

1) Heinzerling, Ch., Die Konservierung der Nahrungs- und Genufsmittel, 1884, S. 283.

König, J., Die Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genufsmittel, IV. Aufl., 1904, S. 512 u. 928.

Die Mittel der Konservierung bestehen nun darin, eine oder mehrere dieser Bedingungen aufzuheben, aber zugleich dafür zu sorgen, dafs das betreffende Nahrungs- oder Genufsmittel bei der Haltbarmachung nicht leidet.

Eines der besten und zugleich am meisten angewendeten Verfahren ist im Jahre 1804 von Appert angegeben worden. Im Laufe der Zeit hat es allerdings eine Reihe von Verbesserungen erfahren. Es beruht auf dem Erhitzen der verschiedenen Nahrungsmittel unter Luftabschlufs. Letzterer wirkt nur insofern konservierend, als dadurch Fäulnisbakterien und andere Mikroben ferngehalten werden. In den Fabriken wird gegenwärtig wie folgt gearbeitet: Die sorgfältig gereinigten und einige Minuten vorgekochten Gemüse werden mit der nötigen Menge Wasser und Kochsalz in Blechdosen hineingelegt, diese verschlossen und je nach Art und Zusammensetzung der betreffenden Sorte 15—25 Minuten im Autoklaven mit gespanntem Dampfe bei 112°—117°[1]) sterilisiert, rasch herausgenommen und zur Abkühlung der ganze Inhalt in kaltes Wasser getaucht.

Das Reichsgesetz[2]) von 1887, welches die Innenverzinnung der Konservendosen auf einen maximalen Bleigehalt von 1% normierte und für die Verlötung ein Lot von höchstens 10% vorschrieb, hatte neben anderen Vorteilen auch eine gewaltige Umänderung in der Konstruktion der angewandten Dosen im Gefolge. Da die Lötung mit dem vorgeschriebenen Lote eine schwierige war, so suchte man die Zulötung der Dosen so viel wie möglich zu umgehen, und dies gab die Anregung zur Erfindung der sogenannten Falzdose. Mit dem Konserveninhalt kommt derart nur noch eine kleine, schmale Lötnat in Berührung, entsprechend der Höhe der Dose. Zur Erzielung eines hermetischen Abschlusses am Boden und Deckel der Falzdose ist das Einlegen eines Dichtungsringes aus Gummi erforderlich.

1) Aderhold, R., Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., 1899, S. 17—20. Konserven-Zeitung, Jahrg. 1901, S. 365.

2) Chemiker-Zeitung, Jahrg. 1891, S. 1109, Reichsgesetz, betr. den Verkehr mit blei- und zinkhaltigen Gegenständen vom 25. Juni 1887.

Da die durch Kochen konservierten grünen Gemüse meist ihre lebhafte, natürliche Farbe verändern, grau- oder braungrün-mifsfarbig werden, so sucht man dem Wunsche des konsumierenden Publikums gemäfs das ursprüngliche, frische Aussehen dadurch wieder herzustellen, dafs man dem Wasser, das beim Vorkochen angewendet wird, eine geringe Menge Kupfersulfat zusetzt; so verwendet man nach Tschirch[1]) auf 60—70 kg Gemüse 30—70 g Kupfersulfat und 100 l Wasser. Nach Lehmann[2]) geschieht die Grünfärbung durch kurzes, 3—8 Minuten dauerndes Brühen in einem Kupferkessel, auf 30—40 kg Gemüse 100 l Wasser und 10—15 g Kupfersulfat.

Die geringen Mengen von Kupfer, welche nach zahlreichen Untersuchungen (Gautier[3]), Lehmann, Tschirch, Nikitin[4]) bei dieser Gelegenheit von den Gemüsen aufgenommen werden, haben jedenfalls keine konservierende Wirkung.

Nach Tschirch bildet sich bei Kupferanwesenheit das brillantgrüne Kupfersalz der bräunlichen Phyllocyaninsäure $(C_{24}H_{27}N_2O_4)_2Cu$, welches hauptsächlich die Erhaltung der grünen Farbe bedingt.

Während bis vor kurzer Zeit niemand an eine organische Vergiftung durch derartig hergestellte Konserven mit Gemüse dachte, trat die Möglichkeit einer solchen durch die bedauerlichen Vorgänge in der Darmstädter Alicenkochschule in den Vordergrund, als dort im Januar des vorigen Jahres durch den Genufs von in Salat verwendeten Bohnenkonserven von 52 Personen 21 schwer erkrankten, wovon dann 11 ihr Leben einbüfsen mufsten.

Wie die angestellte Untersuchung ergab, waren die betreffenden Bohnen in der Kochschule selbst, in Büchsen mit Gummiring, Deckel und federndem Bügel verschlossen, konser-

1) Tschirch, A., Das Kupfer. Stuttgart, 1893.

2) Lehmann, K. B., Hygienische Studien über Kupfer. Archiv f. Hygiene, Bd. 24, 1895, S. 1.

3) Gautier, E. J. Armand, Le Cuivre et le Plomb dans l'alimentation et l'industrie au point de vue de l'hygiène, Paris, 1883.

4) Nikitin, A., Das Färben der grünen Erbsen mit Kupfersalzen und ihr einfachster Nachweis. Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genufsmittel, Jahrg. 1900, S. 703.

viert worden. Beim Öffnen derselben soll nach den Angaben äufserlich keine stärkere Zersetzung aufgetreten sein; nur machte sich ein ungewöhnlicher Geruch geltend.

Aus den seither veröffentlichten Berichten und den geschilderten Krankheitssymptomen ist zu entnehmen, dafs es sich bei diesem bedauerlichen Unglücksfall nicht um eine Vergiftung mit Metallen, sondern um eine solche mit Toxinen, die als Stoffwechselprodukte von Bakterien auftraten, gehandelt hat. Dafs hierbei nicht, wie in verschiedenen Tagesblättern zurzeit behauptet wurde, ein ungenügender Kochsalzzusatz in Betracht kam, ist schon von anderer Seite[1]) genügend betont worden. Landmann[2]) gewann aus einem Stückchen Bohnensalat, das er noch in einem Kohlenkasten vorfand, durch Schütteln mit 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung und nachheriges keimfreies Filtrieren ein Gift, von dem 2 weifse Mäuse bei subkutaner Injektion von 0,5 ccm nach 24 Stunden starben. Wurde das erhaltene Filtrat kurze Zeit aufgekocht, so hatte es seine toxische Wirkung eingebüfst. Hiermit stimmt auch die Tatsache überein, dafs diejenigen, welche von dem gleichen Salat genossen hatten, der kurze Zeit auf dem heifsen Herde gestanden und derart durch Zufall ins Kochen geraten war, absolut keine schädlichen Wirkungen verspürten.

Nachdem Landmann derart die Anwesenheit eines starken, durch Kochen zerstörbaren Giftes im Bohnensalate nachgewiesen hatte, suchte er auch die Herkunft desselben festzustellen und fand als Ursache der Toxinbildung einen sporenbildenden, anaeroben Bazillus, der mit dem von van Ermengen zuerst in Schinken gefundenen Bacillus botulinus die weitgehendste Ähnlichkeit besafs. Schon öfter war derselbe als Ursache von Fleischvergiftungen erkannt worden.

Gaffky[3]), dem neben zwei leeren noch eine $1^1/_2$ kg wiegende uneröffnete, mit Bohnen gefüllte Weifsblechbüchse zur Unter-

1) Konserven-Zeitung, Jahrg. 1904, Nr. 8, S. 80.

2) Landmann, G., Über die Ursache der Darmstädter Bohnenvergiftung. Hygienische Rundschau, XIV. Jahrg., Nr. 10.

3) Gaffky, Alice-Kochschule. Darmstädter »Täglicher Anzeiger« vom 9. Februar 1904.

suchung übergeben worden war, konnte ebenfalls ein nur bei Luftabschlufs wachsendes, Buttersäure bildendes Bakterium isolieren, das kräftig wirkende Toxine bildete und, wie er sich ausdrückt, mit Bacillus botulinus »einige Ähnlichkeit« besafs.

Auch in einigen Artikeln der »Konserven-Zeitung«[1]) wird entschieden die Ansicht vertreten, dafs es sich bei vorliegendem Unglücksfall um eine Vergiftung mit Bakterien, resp. mit Toxinen handelte, dafs aber nicht der Bacillus botulinus in Frage komme, sondern die beiden fakultativ anaeroben Proteusarten: Bacillus proteus mirabilis und Bacillus proteus vulgaris, die ja in faulenden Substanzen öfters anzutreffen sind.

Der tragische Vorfall in Darmstadt war leicht geeignet, Beängstigungen hervorzurufen und gegen die Konservennahrung Mifstrauen zu erwecken; da ja auch in den bestgeleiteten Fabriken alljährlich ein gewisser Prozentsatz der sterilisierten Gemüse zugrunde geht, was sich namentlich durch eine kräftige Gasbildung im Innern der Dose bemerkbar macht. Solche Büchsen werden in Fachkreisen ihrer veränderten Form wegen als »bombiert« bezeichnet.

Trotz einer sorgfältig ausgeübten Kontrolle seitens der Fabrik kommt es hin und wieder vor, dafs solche Konserven in die Hände des konsumierenden Publikums gelangen, indem sie etwa erst nachträglich noch bombieren können.

Es schien mir daher vom hygienischen Standpunkte aus äufserst wichtig, derart verdorbene Gemüsekonserven näher zu untersuchen, da ja, wie auch von anderer Seite wiederholt hervorgehoben, anzunehmen war, dafs sich auch hier ähnliche toxische Wirkungen geltend machen könnten wie bei denjenigen in der Alicen-Kochschule und vielleicht bis anhin nur deshalb noch keinen Schaden bewirkt hatten, weil sie vor dem Genusse gekocht worden waren.

Der Umstand, dafs über die biologischen Eigenschaften der Zerstörer von Gemüsekonserven in der Literatur bis jetzt nur

1) Konserven-Zeitung, Jahrg. 1904, Nr. 6, 7, 8. Redakteur G. Brandau, Braunschweig.

ganz wenig bekannt ist, wahrscheinlich weil solche bombierte Dosen im Handel nur selten anzutreffen sind und für die betreffenden Forscher nur schwierig zu erhalten waren, liefs es gerechtfertigt erscheinen, diese interessanten Lebewesen, die entweder grofse Widerstandsfähigkeit gegen hohe Temperaturen haben müssen oder vielleicht erst nachträglich in die Büchsen gelangen, näher kennen zu lernen.

Das zu meinen Untersuchungen nötige Material wurde mir in zuvorkommender Weise teils von Konserven-Handlungen, zum gröfsten Teile aber von verschiedenen Fabriken zur Verfügung gestellt und gab man mir, meinem Wunsche gemäfs, möglichst solche Objekte, bei denen man glaubte, dafs die Bombage nicht auf einen Defekt der Dose, sondern auf mangelhafte Sterilisation zurückzuführen sei.

Wie aus der Literatur ersichtlich, war Aderhold[1]) der erste, der sich mit diesem Gegenstande etwas eingehender befafste. Er versuchte aus zehn verschiedenen bombierten Gemüsekonserven die Verderber zu züchten, doch gelang es ihm trotz der vielseitigsten Bemühungen nie, in den hergestellten Kulturen Wachstum zu erhalten, nach seiner Meinung, weil die betreffenden Organismen »einfach abgestorben waren«.

Wie bereits angedeutet, ist die sachbezügliche Literatur zurzeit noch eine recht spärliche. Neben der schon zitierten Arbeit von Aderhold kommt noch namentlich diejenige von K. von Wahl[2]) in Betracht.

Wie aus den kurzen interessanten Abhandlungen ersichtlich ist, hat Verfasser anfänglich selbst Konserven eingemacht und zu diesem Zwecke Karotten, Spargeln, Erbsen in Gläsern bei strömendem Dampfe sterilisiert. Trotz zweistündiger Kochdauer verdarben alle und es konnten als Zerstörer Endosporen bildende Stäbchenbakterien isoliert werden, die aber leider sonst nicht

---

1) Aderhold, R., Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., 1899, Bd. 5, S. 17—20.

2) K. v. Wahl, Über das Verderben der Konserven. Konserven-Zeitung, Jahrg. 1903, Nr. 11 u. 12. — Untersuchungen über Konservenverderber. Berichte der Grofsherzoglich Badischen Landwirtschaftlichen Versuchsanstalt, Augustenberg, 1902, S. 33—35 Bericht 1903, S. 35—36.

näher beschrieben wurden. Später untersuchte genannter Autor auch Fabrikkonserven, und konnte hier wieder mehrere Arten von Mikroorganismen isolieren, die zum Teil sehr widerstandsfähige Sporen zeigten, welche ein zweistündiges Kochen überdauerten. Höchst interessant ist ferner die Mitteilung, dafs die Sporen je nach dem Nährsubstrat, auf dem sie sich gebildet und dem Material, auf dem sie zur Prüfung angetrocknet wurden, an Lebensdauer einbüfsten oder gewannen. Leider gibt K. v. Wahl in beiden Notizen keine näheren biologischen Eigenschaften der gefundenen Mikroben an, doch stellt er eine ausführliche Darstellung seiner Untersuchungen in Aussicht.

Aderhold[1]) glaubt, dafs es keine für eine bestimmte Gemüseart spezifischen Zerstörer gebe, und wahrscheinlich keine »spezifischen Gemüsezerstörer überhaupt.« K. v. Wahl aber fand in gleichartigen Konserven verschiedener Herkunft oft die gleichen Verderber und in Konserven verschiedener Sorte niemals die gleichen Bakterien.

Nach letzterem Forscher würde sich somit die in Fachkreisen gehegte Ansicht bestätigen, dafs sich verschiedene Gemüsearten, unter den gleichen Bedingungen konserviert, verschieden lang halten.

Nach einer anderen von K. Kroemer[2]) erstatteten, kurzen Notiz ist zu ersehen, dafs man sich in der Versuchsanstalt Geisenheim ebenfalls mit dem gleichen Gegenstand befafst. Doch war bei Abschlufs meiner Untersuchungen eine weitere Publikation noch nicht erfolgt.

Die Redaktion der »Konserven-Zeitung« hat seit einigen Jahren in Braunschweig eine Untersuchungsstation errichtet, wo die Konservenfabriken in kürzester Zeit ihre Produkte auf Keimgehalt untersuchen lassen können. Diese Einrichtung soll sich nach Mitteilungen der Praxis sehr gut bewährt haben, indem die betreffenden Fabriken derart eine gewisse Kontrolle für ge-

1) a. a. O., S. 6.

2) Untersuchungen über die Bakterien der Obst- und Gemüsekonserven. Bericht der Königl. Lehranstalt für Wein-, Obst- und Gartenbau zu Geisenheim a. Rh., 1903, S. 114—115. (Berlin bei P. Parey.)

nügende Sterilisation besitzen. Will also ein Fabrikant die Zeitdauer und die Höhe der Temperatur, die notwendig ist, um eine bestimmte Konserve sicher steril zu bekommen, genau kennen, so braucht er nur eine gewisse Anzahl verschieden lang und bei verschiedenen Drucken hergestellter Büchsen zur Untersuchung zu senden und wird die gewünschten Daten erhalten.

Die Redaktion obiger Zeitschrift berichtet in einem Aufsatze[1]), betitelt: »Nochmals die Vergiftung in Darmstadt« von Versuchen, bei denen in bombierten Büchsen einige streng anaerobe Buttersäurebazillen, ferner solche vom Kolitypus und einige unbekannte Mikroorganismen gefunden wurden.

Bakteriologische Untersuchungen.

Die von mir vorgenommenen Untersuchungen wurden wie folgt ausgeführt: Unmittelbar vor der Probeentnahme aus einer bombierten Büchse wurde diese tüchtig geschüttelt, nach Entfernen der Etiketten mit Bürste und Seife gut gereinigt und der Deckel und die obersten Partien der Wand mittels eines Bunsenbrenners gut abgebrannt, bis zum Erkalten mit einem vorher sterilisierten Glasgefäfse bedeckt, alsdann mit einem spitzigen, mehrere Male durch die Gasflamme gezogenen, langen Eisennagel eine Öffnung in die Mitte des Deckels gebohrt.

Mit einer sterilen Wasserpipette wurde nun Flüssigkeit aus dem Innern in verschiedenen Höhenlagen herausgenommen und jedesmal folgende Kulturen damit angesetzt:

Je 1 hohe Kultur in Traubenzuckeragar mit 0,1 und 1 ccm Brühe, bei Temperaturen von 37° und 30° gehalten.

Je 2 Kulturen in Traubenzuckerbouillon mit 0,1 und 1 ccm Brühe bei 37°, 30° und 22°.

Um einen möglichst passenden Nährboden zu schaffen, verwendete ich jeweils den flüssigen Inhalt steril gebliebener Büchsen der betreffenden Gemüseart und gab jedesmal 1 ccm

1) Konserven-Zeitung, Nochmals die Vergiftung in Darmstadt, Jahrg. 1904, Nr. 8.

der zu untersuchenden Brühe in solche Röhrchen, die ich bei 37°, 30° und 22° beobachtete.

Öfters leistete mir auch ein Nährboden, hergestellt mit der Flüssigkeit einer keimfreien Dose und der nötigen Menge Gelatine oder Agar-Agar versetzt, gute Dienste.

Neben obigen Kulturen wurden noch 2 anaerobe in Traubenzuckergelatine hergestellt unter Verwendung von 0,5 ccm flüssigem Büchseninhalt. Überdies machte ich jedesmal mit einer Platinöse zwei Strichkulturen auf schiefem Agar für die Züchtung bei Bruttemperatur. Schliefslich gab ich noch je 1 ccm in zwei verflüssigte Traubenzuckergelatine und stellte damit Platten her.

War während vier Wochen kein Wachstum auf obigen Kulturen zu bemerken, so wurden sie zerstört.

Kleine Mengen des Büchseninhaltes wurden sowohl im hängenden Tropfen als auch im gefärbten Präparate jedesmal auf Bakterien mikroskopisch untersucht.

Eine jedesmalige Prüfung der betreffenden Dose auf Dichtigkeit nahm ich in der Weise vor, dafs im Deckel mit einer Blechschere eine runde Öffnung gemacht wurde, der Inhalt mit Wasser ausgespült und die Büchse durch Auflötung eines mit einem Rohrstutzen versehenen Bleches wieder verschlossen. Die derartig vorbereitete Büchse wurde hierauf in eine starke Fluoresceïnlösung gestellt, der Stutzen durch Schlauch mit einer Wasserstrahlpumpe in Verbindung gesetzt und während ca. 4 Stunden einem Vakuum von 15 mm Hg. ausgesetzt. Nach dieser Zeit wurde die Büchse herausgenommen, möglichst von Farbstoff befreit, gut abgetrocknet und in der Mitte ihrer Höhe durchschnitten. Mit Leichtigkeit war derart ein eventueller Eintritt von Farbstofflösung bzw. Undichtigkeit zu erkennen.

Die Tierversuche wurden in Gegenwart von Herrn Professor Dr. O. Roth ausgeführt. Als Versuchstiere verwendete ich weifse Mäuse, denen ich in den weitaus meisten Fällen etwas von dem unfiltrierten Inhalt bombierter Büchsen unter die Rückenhaut einspritzte. Da anfänglich Toxine in den verdorbenen Dosen vermutet wurden, so filtrierte ich in Nr. 1, 2

und 3 die Brühe durch Porzellanfilter mit der Absicht, sobald sich schädliche Wirkungen bemerkbar machen sollten, auch Tierversuche mit den isolierten Bakterien vorzunehmen.

Meistens wurden die Versuchstiere während vier Wochen beobachtet und dann seziert.

Ich lasse nun die Protokolle meiner Untersuchungen folgen:

Büchse Nr. 1.

Inhalt ca. 16 Monate alte, grüne Erbsen, äufserlich sehr kräftig bombiert. daher beim Öffnen eine Menge unangenehm riechende Gase; Brühe schäumt stark auf, getrübt, unansehnliche, gelbgraue Farbe.

Säureproduktion: 10 ccm Brühe erforderten zur Neutralisation 4,25 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Grofse Zahl etwa 5—6 mal so langer als dicker Stäbchen; im hängenden Tropfen stark beweglich; daneben vereinzelt lange, fadenförmig aneinandergelagerte Stäbchen. Zuweilen findet man grofse, stark lichtbrechende Sporen.

Bemerkungen: Auf den wie oben angegeben hergestellten Kulturen erhielt ich nur eine Bakterienart, die nach ihrem morphologischen, wie auch biologischen Verhalten in die Gruppe des Bacillus amylobacter van Tieghem[1]) clostridium butyricum Prazmowski gehört.

Tierversuche: Traubenzuckerbouillon mit der isolierten Bakterienart eingeimpft, wurde nach 8 Tagen filtriert, mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung 1:4 verdünnt und zwei Mäusen subkutan injiziert: Maus Nr. 1 0,5 ccm, Maus Nr. 2 1 ccm. Tiere bleiben gesund, auch Verfütterung einer 5 Tage alten unfiltrierten Bouillonkultur ergibt ein negatives Resultat. Zwei weitere Mäuse erhielten von einer 10 Tage alten, keimfrei filtrierten Traubenzuckerbouillon: Maus Nr. 3 1 ccm, Maus Nr. 4 1 ccm; trotzdem Tiere normal. Auch die Sektion aller Tiere zeigt keine Veränderungen.

Dichtigkeit der Büchse: Dicht.

Büchse Nr. 2.

Enthaltend $^1/_2$ l Erbsen, 11 Monate alt; äufserlich wenig bombiert, daher beim Öffnen nur geringe Mengen Gas. Geruch und Farbe der Büchse normal, schwach getrübt.

Mikroskopischer Befund: Mehrere grofse, spindelförmige Stäbchen, ähnlich Bacillus amylobakter; vereinzelt Fäden von grofsen, dicken Stäbchen an Bacillus megatherium erinnernd; im ganzen sind viele Kokken vorherrschend.

---

1) Matzuschita, Bakteriolog. Diagnostik, 1902, S. 492.
Migula, System der Bakterien, II. Bd., S. 536.

Säureproduktion: 10 ccm Erbsenbrühe verlangten 1,05 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Tierversuche: Zwei Mäuse bekamen subkutan keimfrei filtrierte Erbsenbrühe: Maus Nr. 5 0,6 ccm, Maus Nr. 6 0,4 ccm, Befinden normal.

Bemerkungen: Obschon der mikroskopische Befund auf die Anwesenheit einer grofsen Zahl von Bakterien schliefsen liefs, konnte trotz der verschiedenen Kulturen nie Wachstum erhalten werden.

Dichtigkeit der Büchse: Dicht.

Büchse Nr. 3.

Inhalt 11 Monate alte grüne Erbsen, Boden und Deckel stark bombiert, beim Öffnen neben stark aufschäumender Flüssigkeit nach Buttersäure riechende Gase. Erbsenbrühe stark trübe, schmutzig graugrün. Im Innern der Dose an vielen Stellen grauschwarze, matte, moiréeartige Flecken von Zinnsulfid[1]).

Säuregrad: 10 ccm Brühe verlangten 2,90 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Grofse Zahl Kokken oder Kurzstäbchen, vielfach kettenförmig aneinandergelagert.

Tierversuche: Zwei Mäuse erhielten subkutan keimfrei filtrierte Erbsenbrühe: Maus Nr. 7 = 0,7 ccm; Maus Nr. 8 = 0,3 ccm: Verhalten normal.

Bemerkungen: Leider läfst sich hier die Frage, durch welche Bakterienart die Bombage verursacht wurde, nicht beantworten, da die Kulturen kein Wachstum zeigten.

Dichtigkeit der Büchse: Undicht an der Lötnatfalz.

Büchse Nr. 4.

Inhalt $^1/_2$ l Erbsen, wenig bombiert, zeigt Erscheinung des »Flatterns«; deshalb beim Öffnen wenig Gas, Flüssigkeit wenig trübe, von graugrüner Farbe. Innerlich war Zinnüberzug stark angegriffen (»mattiert«.)

Säuregrad: 10 ccm Erbsenbrühe entsprachen 3,62 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Viele kurze, etwa 1,5 mal so lang als breite Stäbchen, an den Enden abgerundet; vereinzelt kommen noch schwach bewegliche, nach Gram färbbare, gröfsere, fadenförmig aneinandergelagerte Stäbchen vor. Hefezellen mit deutlichen Sprossungen sind vereinzelt anwesend.

In 1 ccm Brühe sind im Mittel 300 Keime enthalten.

---

1) Beckurts, H., Bildung von Schwefelzinn in Weifsblechbüchsen. Chemiker-Zeitung, 1889, S. 1523.

Reufs, W., Zur Chemie der Konservenfabrikation. Chemiker-Zeitung, 1889, S. 1428.

Rössing, A., Mitteilungen über das Schwarzwerden der Gemüsekonserven in Weifsblechdosen. Zeitschr. f. analyt. Chemie, 1896, Bd. 35, S. 38.

Tierversuche: Zwei Mäuse bekamen subkutan direkt entnommenen Büchseninhalt: Maus Nr. 9 = 1 ccm; Maus Nr. 10 = 1 ccm, ohne Störung im Befinden.

Bemerkungen: Aus den verschiedenen Kulturen isolierte ich zwei Mikroorganismen, nämlich: Bacillus subtilis (Ehrenberg) Cohn[1]) und eine Hefe, die traubenzuckerhaltige Nährböden rasch und kräftig vergährte.

Dichtigkeit der Büchse: Undicht, wo, war nicht mehr zu ermitteln, da zu viel Farbstofflösung eingesaugt worden war.

Büchse Nr. 5.

Inhalt 1 l junge Bohnen, 1 Jahr alt, äufserlich wenig bombiert, Geruch der Flüssigkeit normal, Farbe graugrün, stark trübe.

Säureproduktion: 10 ccm Bohnenbrühe erforderten 3,18 $\frac{n}{10}$ NaOH.

Mikroskopischer Befund: Grofse, etwa achtmal so lange als breite, schlanke Stäbchen; viele sind gekrümmt, und da sie sich gerne fadenförmig hintereinander lagern, so erwecken sie den Eindruck eines Spirillums; nach Gram nicht färbbar.

Auf den Gelatineplatten zählte ich im Mittel pro 1 ccm Brühe 15000 Kolonien.

Morphologie der Reinkultur: Grofse, etwa achtmal so lange als breite Stäbchen, bilden gerne die genannten, gekrümmten Involutionsformen.

Gelatineplatten: Makroskopisch: Oberflächenkolonien bläulichweifs, durchsichtig; Wachstum langsam. Tiefenkolonien erscheinen als gelbe Pünktchen. Bei schwacher Vergröfserung zarter, dünner Belag; Randabgrenzung unscharf; die ganze Kolonie ist gleichmäfsig, fein gekörnt. Die tiefer liegenden sind meistens rund, auch oval, ebenfalls schwach gekörnt.

Gelatinestich: Im Stichkanal nur ganz geringes Wachstum, der dünne, zarte, oberflächliche Rand zeigt keine Ausbuchtungen; Verflüssigung tritt nie ein.

Agarstrich: Bei 30° zarter, glatter, feuchtglänzender, durchsichtiger Belag.

Kartoffeln: Zarter Belag, am Rande Ausbuchtungen.

Milch: Gallertartige, gleichmäfsige Gerinnung, die nach 8 Tagen klumpig wird mit wässerigem Serum.

Traubenzuckerbouillon: Trübung nach 3 Tagen, schwache Gasbildung.

Temperaturverhältnisse: Wächst bei Zimmertemperatur langsam.

Luftbedürfnis: Fakultativ anaerob.

Tierversuche: Maus Nr. 11 = 0,6 ccm, Maus Nr. 12 = 0,3 ccm unfiltrierte Brühe subkutan; normal.

Bemerkungen: Nach diesem Befunde war mir eine Artbestimmung nicht möglich.

Dichtigkeit der Dose: Undicht am Lötstellefalz.

---

1) Matzuschita, Diagn., 1. Aufl., S. 2.

Büchse Nr. 6.

1 Jahr alte Erbsen, beidseitig stark bombiert, beim Öffnen Geruch nach Buttersäure; Flüssigkeit gelblichweifs, stark trübe.

Azidität: 10 ccm Brühe erforderten 4,7 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Grofse, dicke, sporenhaltige, manchmal spindelförmig angeschwollene Stäbchen, zeigen Granulosereaktion, bewegen sich lebhaft.

Tierversuche: Maus Nr. 13 = 0,3 ccm, Maus Nr. 14 = 0,5 ccm unfiltrierter Brühe, subkutan, ohne Wirkung.

Bemerkungen: Diese Bakterienart stimmt morphologisch, wie auch biologisch mit der in Büchse Nr. 1 gefundenen überein.

Dichtigkeit der Dose: Dicht.

Büchse Nr. 7.

Inhalt grüne Bohnen, 1 Jahr alt, wenig bombiert, Flüssigkeit schwach trübe, Geruch normal.

Säureproduktion: Für 10 ccm Brühe waren 6,2 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH erforderlich.

1 ccm Brühe enthielt im Mittel 400 Keime.

Mikroskopischer Befund: Kurze, dicke, 2—3 mal so lang als breite Stäbchen mit abgerundeten Enden, nach Gram nicht färbbar; sie sind lebhaft beweglich.

Gelatineplatten: Makroskopisch: Nach 3 Tagen gelblichweifse, punktförmige Kolonien; bei schwacher Vergröfserung durchscheinende, körnige Struktur.

Gelatinestich: Wachstum bis in die Tiefe des Stichkanales, oberflächlich zarter, gelblichweifser Belag.

Agarstrich: Schwach gelbliche, feuchtglänzende Auflagerung.

Kartoffeln: Feuchtglänzender, zitronengelber Belag.

Traubenzuckerbouillon: Nach 48 Stunden starke Trübung; schwache Gasentwicklung; Nährböden aus Bohnen werden ebenfalls schwach vergärt.

Temperaturverhältnisse: Wächst bei 30° am besten.

Tierversuche: Maus Nr. 15 = 0,6 ccm, Maus Nr. 16 = 0,3 ccm subkutan unfiltrierter Bohnenbrühe; keine Wirkung.

Bemerkungen: Identifizierung mit einer schon beschriebenen Bakterienart war mir nicht möglich.

Dichtigkeit der Büchse: Undicht, an Berührungsstelle Lötnat und Falz.

Büchse Nr. 8.

Inhalt junge Erbsen, 1 Jahr alt, stark bombiert, beim Öffnen widerlich riechende Gase, Flüssigkeit schäumt stark auf, trübe, graugrün. Innerlich zeigt Büchse vielerorts Belag von Schwefelzinn.

Azidität: 10 ccm Erbsenbrühe verlangten 4,73 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Mittellange dicke Stäbchen mit abgerundeten Enden, neben kurzen, dicken, die sich nach Gram färben.

Tierversuche: Maus Nr. 17 = 0,6 ccm unfiltrierte Brühe, subkutan, Maus Nr. 18 mit ebensolcher Brühe gefüttert; Maus Nr 19 = 0,3 ccm keimfrei filtrierter Erbsenbrühe subkutan. Befinden aller Tiere normal.

Bemerkungen: Trotz verschiedener Kulturen, auch auf solchen mit Erbsen, kein Wachstum.

Dichtigkeit der Dose: Dicht.

Büchse Nr. 9.

Inhalt Wachsbohnen, 1 Jahr alt, wenig bombiert, daher nur wenig Gas beim Öffnen; Flüssigkeit schwach trübe, sonst normal.

Säureproduktion: 10 ccm Bohnenbrühe erforderten 1,34 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Lange, dünne, schwachgebogene, manchmal spirillenförmig angeordnete Stäbchen, wahrscheinlich sind es Involutionsformen. Daneben vereinzelt noch kurze, dicke Stäbchen.

Tierversuche: Maus Nr. 20 = 0,2 ccm, Maus Nr. 21 = 0,7 ccm unfiltrierter Brühe subkutan; normal.

Kulturversuche: Sowohl aerob als auch anaerob in den verschiedenen Nährböden kein Wachstum.

Dichtigkeit der Dose: Undicht, wo, war nicht zu ermitteln.

Büchse Nr. 10.

1 Jahr alte Erbsen, sehr kräftig bombiert, beim Öffnen heftige Gasentwicklung, Flüssigkeit stark trübe, säuerlich.

Azidität: 10 ccm erforderten zur Neutralisation 5,52 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Kurze, etwa 2—4mal so lange als breite Stäbchen in grofser Zahl, an den Enden abgerundet, häufig reihenförmig angeordnet; lebhaft beweglich. Es scheint sich nur um eine einzige Art zu handeln.

Bemerkungen: Alle durch die Kulturen erhaltenen Merkmale, auch die Widerstandsfähigkeit lassen auf Identität dieser Bakterienart mit Bacillus brassicae acidae[1]) schliefsen, der zuerst von Conrad als ein Erreger der Sauerkrautgärung erkannt worden war.

Tierversuche: Subkutan Maus Nr. 23 = 0,5 ccm; Maus Nr. 24 = 0,9 ccm direkt entnommener Brühe; Verhalten normal.

Dichtigkeit der Büchse: Dicht.

---

1) Matzuschita, Diagn. S. 318. — Migula, System d. Bakt. II, S. 737.

Büchse Nr. 11.

Inhalt 13 Monate alte Erbsen, auf beiden Seiten kräftig bombiert; beim Öffnen eine grofse Menge unangenehm riechende Gase neben schmutzig graugrüner stark aufschäumender Brühe.

Säuregrad: 10 ccm Brühe erforderten 3,45 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Kurze, dicke Stäbchen von lebhafter Beweglichkeit, neben vereinzelten Hefezellen und Langstäbchen, die an Kartoffelbazillen erinnern.

Durch die Kultur konnte nur eine einzelne Art isoliert werden, die folgende Eigenschaften zeigt:

Morphologisches Verhalten: Kurze, 2—4 mal so lang als breite Stäbchen, Gram positiv.

Gelatineplatten: Nach 2 Tagen oberflächliche Kolonien stark entwickelt, einzelne mit gelber Färbung. Mikroskopisch um das lichtere Zentrum radiäre Fasern, nach gekerbtem, stark glänzenden Rande zu erkennen. Früh zeigt sich um die Kolonie herum eine verflüssigte Zone von gelber Farbe. Kleinere Kolonien haben ein gegen gekerbten Rand verlaufendes Liniensystem. Auf Erbsengelatine entwickeln sich Kolonien in gleicher Weise, aber langsamer.

Gelatinestich: Wachstum bis in die Tiefe des Impfstiches; an der Oberfläche flach ausgebreitete, zitronengelbe Auflagerung; bald beginnt die Verflüssigung, zuerst schreitet sie gegen die Glaswand vor und greift dann erst in die Tiefe; in der verflüssigten Gelatine entsteht ein gelber, flockiger Niederschlag.

Agarstrich: Gelblichweisse, feuchtglänzende Auflagerung mit feinen Einbuchtungen am Rande.

Kartoffeln: Gelbe, glänzende Auflagerung mit kräftigen Ausbuchtungen am Rande.

Bouillon: Nach 24 Stunden Trübung; später bildet sich eine gelblich gefärbte Kahmhaut.

Gasentwicklung: Traubenzuckerhaltige Nährböden werden rasch und kräftig vergärt; solche aus Erbsen weniger rasch.

Temperaturverhältnisse: Wächst bei Zimmer- und Bruttemperatur.

Schnelligkeit des Wachstums: Wächst rasch.

Farbenproduktion: Erzeugt bei Luftzutritt einen gelben Farbstoff.

Sporenbildung: Bildet mittelständige Sporen, die aber an Seidenfäden angetrocknet 20 Minuten strömenden Dampf nicht aushalten.

Peptonwasser: Trübt sich stark und gibt die Indolreaktion.

Luftbedürfnis: Fakultativ anaerob.

Tierversuche: Maus Nr. 25 = 0,6 ccm, Maus Nr. 26 = 0,8 ccm subkutan, ohne Störungen.

Bemerkungen: Eine Artbestimmung war mir nicht möglich.

Dichtigkeit der Büchse: Dicht.

Büchse Nr. 12.

3 Monate alte grüne Schmalzbohnen, nur ganz wenig bombiert; die Brühe war stark trübe, von gelblichweifser Farbe, sonst normal. Innerlich war die Büchse an sehr vielen Stellen stark angegriffen.

Azidität: 10 ccm Bohnenbrühe verlangten 8,66 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Grofse Zahl langer, schlanker Stäbchen, neben kürzeren, dicken, die sich nach Gram färben

Tierversuche: Zwei weifse Mäuse erhielten subkutan folgende Mengen unfiltrierter Bohnenbrühe:

Maus Nr. 27 = 0,5 ccm, Maus Nr. 28 = 1,0 ccm; trotzdem keine Veränderungen.

Kulturversuche: Alle fielen negativ aus; auch solche auf Bohnennährböden, was wohl zum Schlusse berechtigt, dafs diese Organismen abgestorben waren.

Dichtigkeit der Büchse: Undicht am Falze.

Büchse Nr. 13.

Enthaltend ca. 4 Monate alte, gemischte Gemüse, wenig bombiert: Flüssigkeit nur schwach getrübt.

Säureproduktion: 10 ccm Brühe verlangten 1,79 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Kurze, dicke, an den Enden abgerundete Stäbchen von lebhafter Bewegung..

In 1 ccm Brühe wurden im Mittel 14 Kolonien gezählt.

Gelatineplatte: Makroskopisch: Oberflächenkolonien meistens rund, mattweifs, glänzend, mit bläulichem Schimmer, gewöhnlich zentralem Kern, Rand scharf und zeigt eine schon makroskopisch leicht zu erkennende Buchtung. Mikroskopisch sind tiefer liegende Kolonien gelblich, scharf umgrenzt; oberflächliche haben am Rande starke Furchungen, um das hellgelbe Zentrum verläuft ein System konzentrischer Kreise.

Gelatinestich: Wachstum bis in die Tiefe des Stichkanales, oberflächlich zarter, ausgebuchteter Belag.

Agarstrich: Weifse, feucht glänzende Auflagerung, am Rande schwach ausgebuchtet.

Kartoffeln: Feuchtglänzender, bräunlichgelber Belag.

Traubenzuckerbouillon: Starke Trübung, weifser Bodensatz, Gasentwicklung (auch Nährböden von Erbsen), Indolreaktion positiv.

Temperaturverhältnisse: Wächst rasch und üppig bei Zimmertemperatur, bei 37° kümmerlich.

Milch: Wird koaguliert.

Tierversuche: Maus Nr. 29 = 0,6 ccm, Maus Nr. 30 = 0,6 ccm direkter Brühe, subkutan, normales Verhalten.

Bemerkungen: Artbestimmungen nicht möglich. Plattenwachstum erinnert an die Koligruppe, gegen dieses spricht aber mangelhaftes Wachstum bei 37°.

Dichtigkeit der Büchse: Undicht bei Lötnatfalz.

Büchse Nr. 14.

Inhalt grüne Erbsen 5 Monate alt, stark bombiert, daher kam beim Öffnen Flüssigkeit unter starkem Aufschäumen hervor.

Azidität: 10 ccm Erbsenbrühe verbrauchten 2,68 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH.

Bemerkungen: Morphologisch und biologisches Verhalten genau gleich wie der in Nr. 13 beschriebene Bazillus.

Tierversuche: Maus Nr. 31 = 0,2 ccm; Maus Nr. 32 = 0,5 ccm subkutan, der unfiltrierten Brühe; normal.

Dichtigkeit der Büchse: Undicht an Lötnat und Falz.

Büchse Nr. 15.

Inhalt Schmalzbohnen, stark bombiert, unangenehm riechende Gase beim Öffnen; Flüssigkeit stark trübe, mifsfarbig.

Säureproduktion: 10 ccm Bohnenbrühe verlangten 5,74 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH zur Neutralisation.

Mikroskopischer Befund: Zweimal so lange als breite Stäbchen neben vereinzelten Hefezellen und Langstäbchen.

1 ccm Bohnenbrühe enthielt im Mittel 3500 Keime.

Aus dieser Büchse konnte nur eine Art isoliert werden:

Morphologisches Verhalten: Kurze, dicke, an den Enden abgerundete, nach Gram färbbare Stäbchen, träge beweglich.

Gelatineplatten: Ohne Vergröfserung: Die oberflächlichen Kolonien erreichen nach 3 Tagen einen Durchmesser von 1—2 mm; später vergröfsern sie sich nur noch wenig, sie sind rein milchweifs und ragen knopfartig über die Gelatine heraus. Bei schwacher Vergröfserung ist nichts besonderes zu erkennen.

Gelatinestich: Wachstum bis in die Tiefe des Kanals; der Stich erscheint am Rande fein gezähnt, oben sind nach einer Seite kleine, perlmutterglänzende Ausläufer.

Agarstrich: Zarter, weifser Belag, der Länge nach gestreift.

Kartoffeln: Kein Wachstum.

Bouillon: Wird getrübt, weifser Bodensatz.

Gasentwicklung: Zuckerhaltige Nährböden werden vergärt, auch solche mit Bohnen hergestellte.

Temperaturverhältnisse: Wächst gut bei Zimmertemperatur, bei 37° gar nicht.

Tierversuche: Maus Nr. 33 = 0,6 ccm; Maus Nr. 34 = 0,8 ccm direkter Brühe, subkutan; normal.

Bemerkungen: Eine Identifizierung war nicht möglich.

Dichtigkeit der Dose: Dicht.

Büchse Nr. 16.

Inhalt 1 1 5 Monate alte Bohnen, kräftig bombiert, beim Öffnen nur wenig Gas, Flüssigkeit stark trübe.

Azidität: 10 ccm entsprachen 8,40 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Überwiegend kurze, dicke Stäbchen, neben vereinzelten Langstäbchen; erstere gering beweglich.

Tierversuche: Maus 35 und 36 wurde 0,5, resp. 0,6 ccm unfiltrierter Brühe injiziert; letztere wurde später noch mit ebensolcher Brühe gefüttert; beide Tiere bleiben normal.

Bemerkungen: Die erhaltene Reinkultur hatte morphologisch, wie auch biologisch die gleichen Eigenschaften wie diejenige in Büchse Nr. 15 vorgefundene.

Dichtigkeit der Büchse: Undicht, wo, nicht zu ermitteln.

Büchse Nr. 17.

5 Monate alte Erbsen, kräftig bombiert; beim Öffnen unangenehm riechende Gase; Flüssigkeit schäumt stark auf, schmutzig, graugrün.

Säuregrad: 10 ccm Erbsenflüssigkeit erforderten 2,35 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH.

Mikroskopischer Befund: Nur eine Art von Bakterien nachweisbar, zwei bis vier mal so lange als breite Stäbchen, Enden abgerundet, Gram positiv, lebhaft beweglich.

In Übereinstimmung damit könnte nur eine Art isoliert werden.

Gelatineplatten: Die oberflächlichen Kolonien sind stark erhaben. Mitte Kern, perlmutterglänzend, weifsgrau. Mikroskopisch Rand scharf, Kolonien stark gefurcht durch eine Menge radiärer Strahlen, gegen Peripherie hin sich verästelnd; ganze Kolonie schwach gekörnt.

Agarplatten: Koliähnliche Kolonien.

Gelatinestich: Wachstum bis in die Tiefe des Stichkanals, Rand gezähnt, oberflächlich feucht glänzende, ausgebuchtete Auflagerung.

Agarstrich: Kräftiger, dicker, gelblichweifser Belag.

Kartoffeln: Dicke, wurzelähnlich verzweigte, gelbe bis grauweifse Auflagerung.

Traubenzuckerbouillon: Starke Trübung mit Häutchen, Indolreaktion positiv; kräftige Gasentwicklung (aus erbsenhaltigen Nährböden ebenfalls).

Milch: Wird koaguliert, keine Serumabscheidung.

Temperaturverhältnisse: Wächst bei 22—30° rasch und am besten.

Sporenbildung: Bildet mittelständige Sporen, Stäbchen schwellen hierbei tonnenförmig an.

Tierversuche: Maus Nr. 37 = 0,9 ccm; Maus Nr. 38 = 0,8 ccm subkutan unfiltrierter Brühe; keine Veränderungen.

Bemerkungen: Identifizierung nicht möglich, scheint in die Koligruppe zu gehören.

Dichtigkeit der Büchse: Undicht, wahrscheinlich durch kräftige Bombage.

Büchse Nr. 18.

Inhalt 4 Monate alte Wachsbohnen, stark bombiert; daher kam beim Öffnen Flüssigkeit zum Vorschein, stark getrübt.

Azidität: 10 ccm Bohnenbrühe verlangten 6,17 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH.

Mikroskopischer Befund: Kurze, dicke Stäbchen mit abgerundeten Enden, mäfsig beweglich, offenbar derselben Art angehörend.

In 1 ccm Brühe sind im Mittel 10000 Keime enthalten.

Gelatineplatten: Makroskopisch: Oberflächenkolonien bilden nach 3 Tagen gelblichweifse Punkte, sich mehr und mehr verfärbend, bis sie schliefslich goldgelb werden. Mikroskopisch meistens kreisrund, Rand scharf, Zentrum etwas dunkler, ganze Kolonie gekörnt.

Agarplatten: Kleinen, gelben Kolonien sind grob gekörnt, in der Mitte etwas dunkler; Rand unscharf.

Gelatinestich: Wachstum bis in die Tiefe des Stichkanals; oberflächlich leichter, gelber Belag mit schwachen Furchungen.

Kartoffeln: Kräftiger, feuchtglänzender, goldgelber Belag; Rand ausgebuchtet, stellenweise korallenartige Ausläufer.

Traubenzuckerbouillon: Trübung, gelbe Haut; später wird ganze Flüssigkeit gelb, Gasbildung; Kulturen in Bohnenbrühe entwickeln ebenfalls Gas, auch gelbe Haut

Dieses Bakterium greift Bohnen an, indem Epidermis eine Menge Blasen zeigt.

Milch: Koaguliert, peptonisiert; Serum färbt sich gelb.

Temperaturverhältnisse: Wächst rasch bei 22—30°, bei 37° nur schlecht.

Luftbedürfnis: Fakultativ anaerob; bei Luftabschlufs kein gelber Farbstoff.

Tierversuche: Maus Nr. 39 = 0,4 ccm; Maus Nr. 40 = 0,8 ccm direkter Brühe, ohne schädliche Wirkung.

Bemerkungen: Einige Merkmale (Farbstoffbildung, Morphologie, Pathogenität für Bohnen) lassen auf Identität mit Bacillus phaseoli, Smith, schliefsen. Leider sind die Angaben in den mir zugänglichen Werken[1]) nur sehr kurz gehalten.

Büchse dicht.

Büchse Nr. 19.

5 Monate alte Erbsen, schwach bombiert, Flüssigkeit wenig trübe.

Säureproduktion: 10 ccm Brühe entsprachen 5,5 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Viele mittelgrofse, dicke Stäbchen, Eindruck von Involutionsformen.

Tierversuche: Maus Nr. 41 = 0,2 ccm; Maus Nr. 42 = 0,7 ccm unfiltriert, subkutan; normal.

Bemerkungen: Alle Kulturversuche negativ: Artbestimmung daher unmöglich.

Dichtigkeit der Büchse: Dicht.

---

1) Matzuschita, Diagnostik, S. 348.
Migula, System d. Bakterien, II. Bd., S. 776.

Büchse Nr. 20.

$^1/_2$ l Bohnen, 4 Monate alt, sehr stark bombiert; beim Öffnen viel Gas, Flüssigkeit schäumt stark auf, trübe.

Säureproduktion: 10 ccm erforderten 1,79 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Grofse Zahl Stäbchen von wechselnder Länge, aber gleicher Dicke, mäfsig beweglich, nach Gram nicht färbbar. Im Mittel wurden in 1 ccm Brühe 350 Kolonien gezählt.

Gelatineplatten: Nach 2 Tagen erreichen die oberflächlichen Kolonien eine Gröfse von 2—3 mm. Dünner, weifser, durchsichtiger Belag. Unter dem Mikroskop grob gekörnt, Rand scharf, ausgebuchtet, nach einigen Tagen am Rande schwache Verflüssigung.

Agarplatten: Mikroskopische Tiefenkolonien am Rande Strahlenkranz, oberflächlicher, weifser, dünner, durchsichtiger Belag.

Kartoffeln: Kräftiger, stark erhabener, anfänglich gelbbrauner, später fleischfarbener Belag mit Ausbuchtungen.

Traubenzuckerbouillon: Stark getrübt, Häutchen, lockeres Sediment, Indolreaktion +; starke Gasentwicklung (auch Milchzuckerglyzerin, Erbsen- und Bohnennährböden).

Sporenbildung: Mittelständige Sporen, sporenhaltiges Material an Seidenfäden hält 20 Minuten Dampf nicht aus.

Gelatinestich: Leichter Belag, später trichterförmige Verflüssigung.

Temperaturverhältnisse: Wächst bei Zimmertemperatur etwas langsamer, bei Bruttemperatur hingegen sehr rasch.

Milch: Koaguliert, peptonisiert, aromatischer Geruch.

Tierversuche: Maus Nr. 43 = 0,8 ccm; Maus Nr. 44 = 0,7 ccm subkutan, direkte Brühe; keine Veränderungen.

Bemerkungen: Identifizierung nicht möglich.

Büchse undicht; scheint durch starken Gasdruck im Innern aufgerissen worden zu sein.

Büchse Nr. 21.

5 Monate alte Bohnen, sehr wenig bombiert; Flüssigkeit schwach trübe.

Säureproduktion: 10 ccm Brühe erforderten 1,05 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Wenige, lange, schlanke Stäbchen, vielfach fadenförmig angeordnet.

Tierversuche: Maus Nr. 45 = 0,2 ccm, Maus Nr. 46 = 0,4 ccm Brühe, subkutan, ohne Wirkung.

Bemerkungen: Morphologie, wie auch Biologie der gezüchteten Reinkultur liefsen auf Identität mit Bacillus mycoides Flügge[1]) schliefsen. Büchse dicht.

1) Matzuschita, Diagnostik, S. 150.
Migula, System d. Bakterien, Bd. II, S. 527.

Büchse Nr. 22.

6 Monate alte Erbsen, kräftig bombiert, heftige Gasentwicklung, Flüssigkeit tritt unter starkem Aufschäumen heraus; stark trübe.

Säureproduktion: 10 ccm Brühe verlangten 2,98 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Viele kurze, dicke Stäbchen, an den Enden abgerundet, gerne fadenförmig aneinander gelagert, Gram negativ.

Tierversuche: Maus Nr. 47 = 0,6 ccm, Maus Nr. 48 = 0,3 ccm unfiltrierte Brühe, subkutan; keine Störungen wahrzunehmen.

Bemerkungen: Aus den verschiedenen Kulturen ergab sich Identität mit dem in Büchse Nr. 10 schon gefundenen Bacillus brassicae acidae.

Büchse dicht.

Büchse Nr. 23.

Inhalt 6 Monate alte Erbsen, schwach bombiert, Flüssigkeit wenig getrübt.

Säuregrad: 10 ccm Brühe erforderten 5,5 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Grofse Zahl kurze, dicke, an den Enden abgerundete, nach Gram schlecht färbbare, wenig bewegliche Stäbchen. Vereinzelt kommen noch Langstäbchen vor.

Tierversuche: Maus Nr. 49 = 0,2 ccm, Maus Nr. 50 = 0,3 ccm unfiltrierter Flüssigkeit, subkutan; keine Veränderungen.

Bemerkungen: Aus allen Kulturen konnte ich nur eine Bakterienart isolieren, die ich mit Bacillus acidi lactici Hueppe[1]) identisch erklären möchte.

Büchse dicht.

Büchse Nr. 24.

Inhalt Erbsen, Alter unbestimmt, wenig bombiert, zeigt »Flattern«. Brühegeruch nach Buttersäure, graugrün, trübe.

Säureproduktion: 10 ccm Brühe erforderten 2,94 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Kurze, dicke Stäbchen mit abgerundeten Enden; vereinzelt auch Hefezellen.

Tierversuche: Maus Nr. 51 = 0,8 ccm, Maus Nr. 52 = 0,2 ccm unfiltrierter Brühe, subkutan; normaler Befund.

Bemerkungen: Auf allen Kulturen konnte kein Wachstum konstatiert werden.

Büchse dicht.

Büchse Nr. 25.

6 Monate alte Bohnen, kräftig bombiert; Flüssigkeit schäumt stark auf, starke trübe, Geruch normal.

Säuregrad: 10 ccm Brühe entsprachen 1,57 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

---

1) Matzuschita, Diagnostik, S. 370.
Migula, System d. Bakterien, II. Bd., S. 327.

Mikroskopischer Befund: Grofse Zahl lange, ziemlich dicke, an den Enden schwach abgerundete, etwa 4—8 mal so lang als breite Stäbchen, reihen sich gerne fadenförmig aneinander, nach Gram nicht oder nur schlecht färbbar; zeigen keine Bewegung.

Es konnte hier nnr eine einzelne Art isoliert werden.

Gelatineplatten: Makroskopisch und mikroskopisch coliähnlich.

Gelatinestich: Wachstum bis in die Tiefe, oberflächlich dünne, zarte Auflagerung, Perlmutterglanz; Verflüssigung tritt nie ein.

Agarstrich: Feuchter, weifser Belag, Rand ausgebuchtet, am Rande dünner und heller, in der Mitte Querstreifung.

Kartoffeln: Coliähnliches Wachstum.

Traubenzuckerbouillon: Lebhafte Trübung mit Häutchen, weifses Sediment; Indolreaktion +; starke Gasbildung (auch in bohnenhaltigen Nährböden).

Milch: Koaguliert.

Sporenbildung: Endogene, stark lichtbrechende Sporen; sporenhaltiges Material hält an Seidenfäden angetrocknet 10 Minuten strömenden Dampf nicht mehr aus.

Temperaturverhältnisse: Wächst gut bei Zimmertemperatur; bei 37° schon nach 10 Stunden kräftiger Belag auf schiefem Agar.

Tierversuche: Maus Nr. 53 = 0,5 ccm; Maus Nr. 54 = 0,3 ccm subkutan, unfiltrierte Brühe; normales Befinden.

Bemerkungen: Artbestimmung nicht möglich, morphologisch gleich wie die in Büchse Nr. 12 gefundene Bakterienart.

Büchse dicht.

Büchse Nr. 26.

Spinat, Alter unbestimmt, wenig bombiert; beim Öffnen Buttersäuregeruch; innerlich Flecken von Schwefelzinn.

Azidität: 10 ccm Brühe verlangten 3,66 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Lange, schlanke Stäbchen, 4—8 mal so lang als breit, scheinen schwach gekörnt, zuweilen fadenförmig angeordnet; nach Gram teilweise färbbar; viele gekrümmt, wahrscheinlich Involutionsformen, einige sind mäfsig beweglich; daneben kommen noch schlanke, 6—10 mal so lang als breite Stäbchen, Grampositive, ebenfalls fadenförmig angeordnete Stäbchen vor.

Tierversuche: Maus Nr. 55 = 0,7 ccm; Maus Nr. 56 = 0,4 ccm direkt entnommene Brühe, subkutan, normales Verhalten.

Bemerkungen: Aus den erhaltenen Kulturen konnte ich zwei Mikroorganismen isolieren, nämlich den schon in Büchse Nr. 25 gefundenen und beschriebenen coliähnlich wachsenden Bazillus und Bacillus bntyricus[1]) Botkin. Bei letzterem konnte einzig kein Wachstum auf Kartoffeln erhalten werden.

Blechdose dicht.

1) Matzuschita, Diagn. S. 250.

Büchse Nr. 27.

Gemischte Gemüse, wenig bombiert, zeigt »Flattern«, 8 Monate alt. Flüssigkeit stark trübe.

Azidität: 10 ccm Brühe verlangten 0,58 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Lange, plumpe Stäbchen, fadenförmig angeordnet.

Tierversuche: Maus Nr. 57 = 0,2 ccm; Maus Nr. 58 = 0,4 ccm subkutan direkter Brühe; normales Verhalten.

Bemerkungen: Die Kulturversuche ergaben zwei Mikroorganismen; nämlich Bacillus mycoides (Wurzel- oder Erdbazillus) und einen Schimmelpilz, zu den Penicilliumarten gehörend.

Büchse undicht, an Lötnat und Falz.

Büchse Nr. 28.

Inhalt Wachsbohnen, nicht bombiert, zeigt das »Flattern«; Geruch der Flüssigkeit normal, wenig getrübt.

Säureproduktion: 10 ccm Brühe erforderten 3,66 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Grofse, 3—5 mal so lang als breite Stäbchen, fadenförmig; daneben sind vereinzelt feine dünne Stäbchen zu erkennen, die leicht beweglich sind.

Tierversuche: Maus Nr. 59 = 1,0 ccm; Maus Nr. 60 = 0,3 ccm unfiltrierter Brühe, subkutan; Befinden normal.

Bemerkungen: Auf den wie früher angegebenen Kulturen konnte ich hier drei Mikroorganismen in Reinkulturen isolieren, nämlich: Bacillus fluorescens liquefacieus,[1]) Bacillus subtilis und ein zu den Penicilliumarten gehörender Schimmelpilz.

Büchse stark undicht, wo, war nicht zu ermitteln.

Büchse Nr. 29.

1 $^1/_2$ Jahre alte Erbsen, sehr stark bombiert; beim Öffnen neben einer Menge nach Buttersäure riechender Gase, heftig aufschäumende Flüssigkeit, mifsfarbig, trübe. Innerlich hat Dose viele matte, dunkelgraue Flecken.

Azidität: 10 ccm Erbsenbrühe erforderten 2,36 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: Lebhaft bewegliche, stark lichtbrechende Sporen besitzende, manchmal spindelförmig angeschwollene 5—6 mal so lang als dicke Stäbchen; schlecht färbbar, besser, wenn sie mit Chloroform behandelt werden; Bazillen sind gekörnt, geben sog. Granulosereaktion.

Tierversuche: Maus Nr. 61 = 0,6 ccm; Maus Nr. 62 = 0,7 ccm direkt entnommene Erbsenbrühe, subkutan, ohne Wirkung.

Bemerkungen: Kulturen ergaben Identität mit dem in Büchse Nr. 1 schon gefundenen Bacillus amylobacter.

Büchse war dicht.

---

1) Eisenberg, Diagn., III. Aufl. S. 112. — Matzuschita, Diagn., S. 132.

Büchse Nr. 30.

Inhalt 18 Monate alte Erbsen, stark bombiert; heftige Gasentwicklung, starkes Aufschäumen der Flüssigkeit beim Öffnen; Brühe gelbgrau, mifsfarbig, stark trübe.

Säureproduktion: 10 ccm Erbsenbrühe erforderten 5,85 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH.

Mikroskopischer Befund: Kurze, plumpe, an den Enden abgerundete Stäbchen; zu zweien oder auch zu vieren fadenförmig aneinandergelagert; nach Gram nicht oder nur schlecht färbbar; lebhaft beweglich.

Tierversuche: Maus Nr. 63 = 0,8 ccm; Maus Nr. 64 = 0,8 ccm unfiltriert, subkutan, ohne Störungen.

Bemerkungen: Morphologisch und biologisch identisch mit dem in Büchse Nr. 23 schon gefundenen Bazillus

Büchse undicht; wahrscheinlich wurde durch den starken Gasdruck im Innern diese Undichtigkeit erzeugt, indem Falz wenig aufgerissen war.

Büchse Nr. 31.

1½ Jahre alter Rosenkohl, sehr stark bombiert; Flüssigkeit säuerlich, stark trübe; Blechdose im Innern an vielen Stellen mit grauschwarzen Flecken bedeckt.

In 1 ccm Brühe wurden im Mittel 52 Keime gezählt.

Tierversuche: Maus Nr. 65 = 0,6 ccm; Maus Nr. 66 = 0,8 ccm unfiltrierte Brühe, subkutan; Verhalten normal.

Bemerkungen: Der mikroskopische Befund, wie auch die angesetzten Kulturen, ergaben die gleiche Bakterienart wie die in Büchse Nr. 23, resp. 30 schon gefundene.

Dose war dicht.

Büchse Nr. 32.

7 Monate alte Bohnen, äufserst kräftig bombiert; Flüssigkeit war grau grün, trübe; Geruch normal.

Säuregrad: 10 ccm Brühe erforderten 2,71 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Mikroskopischer Befund: 4—8 mal so lange als breite Stäbchen, Gramnegativ.

Tierversuche: Maus Nr. 67 = 0,5 ccm; Maus Nr. 68 = 0,5 ccm subkutan, direkt entnommene Brühe; Befinden normal.

Bemerkungen: Morphologische und biologische Eigenschaften (auf den verschiedensten Nährböden) sprechen für Identität mit dem in Büchse Nr. 25 schon beschriebenen Mikroorganismus.

Büchse undicht, doch, wie leicht zu erkennen ist Falz durch den grofsen Gasdruck im Innern aufgerissen worden.

Büchse Nr. 33.

Erbsenpüree, 8 Monate alt, sehr kräftig bombiert; beim Öffnen Geruch nach Buttersäure.

Tierversuche: Gleiche Mengen Erbsenpüree mit Bouillon geschüttelt, absetzen gelassen und von dieser Flüssigkeit zwei Mäusen folgende

Mengen injiziert: Maus Nr. 69 = 0,5 ccm; Maus Nr. 70 = 0,7 ccm; keine pathogene Wirkung.

Bemerkungen: Mikroskopischer Befund und Verhalten auf den verschiedenen Nährmedien sprechen für Identität mit dem in Büchse Nr. 1 schon gefundenen Bacillus amylobacter.

Büchse undicht; auch durch grofsen Gasdruck im Innern am Falz aufgerissen.

Büchse Nr. 34.

Bohnen, 7 Monate alt, sehr stark bombiert; Flüssigkeit stark trübe.

Säureproduktion: 10 ccm Brühe erforderten im Mittel 3,78 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Im Mittel sind in 1 ccm Brühe 3200 Keime enthalten.

Bemerkungen: Im mikroskopischen Präparate konnte nur eine einzelne Bakterienart konstatiert werden, was sich dann später in den Kulturen bestätigte. Morphologisch und biologisch ist dieser Mikroorganismus identisch mit denjenigen in Büchse Nr. 25, resp. 32 schon gefundenen.

Tierversuche: Maus Nr. 71 = 0,7 ccm; Maus Nr. 72 = 0,7 ccm unfiltrierte Brühe, subkutan; keine Wirkung zu erkennen.

Büchse dicht.

Anschliefsend an die obigen Untersuchungen wurden nach den gleichen Methoden 16 Stück verschiedene unverdorbene Gemüsekonserven auf den Keimgehalt untersucht. Wenn auch im Präparate vereinzelt hin und wieder ein Stäbchen angetroffen wurde, so ergaben die Kulturen doch ein negatives Resultat; es scheinen also diese Konserven frei von entwicklungsfähigen Bakterien gewesen zu sein.

Fassen wir die Resultate der vorstehend 34 untersuchten verdorbenen Gemüsekonserven kurz zusammen, so ergeben sich aus deren Befunde folgende Schlüsse:

1. Die Bombagen wurden durch Mikroorganismen verursacht, was sich in 27 Fällen direkt durch die Kulturen, in 7 Fällen aber durch den mikroskopischen Nachweis einer grofsen Zahl von Bakterien in den betreffenden Büchsen beweisen liefs; in letzteren waren höchst wahrscheinlich die Organismen abgestorben.

2. Von den 34 verdorbenen Dosen waren 16 undicht, wovon 5 (Nr. 17, 20, 30, 32, 33) wahrscheinlich während der Aufbewahrung durch den kräftigen Gasdruck im Innern aufgerissen wurden,

was schon äufserlich leicht erkannt werden konnte, da der Falz zum Teil aufgesprengt war.

3. Die betreffende Undichtigkeit ist in den weitaus meisten Fällen an der Übergangsstelle von seitlicher Lötnat und Falz zu finden.

4. Aus den verschiedenen Büchsen gelang es, 20 verschiedene Bakterienarten zu züchten, wovon ich 12 identifizieren konnte.

5. In 9, resp. 12, der 18 dicht befundenen bombierten Büchsen, wenn der in 3 Fällen vorgefundene, nach Ansicht von Hueppe[1]) sporenbildende Bacillus acidi lactici Hueppe noch dazu genommen wird, gelang es mir, mehr oder weniger hitzebeständige Mikroben als Ursache der Bombage aufzufinden, die wohl die Sterilisation in irgend einer Weise überdauert hatten. In 4 Büchsen waren wohl mikroskopisch zahlreiche Bakterien nachzuweisen, während in den Kulturen keine solchen wuchsen. Die Frage der Sporogenität war somit nicht zu entscheiden.

5. Für Erbsen kommt von diesen Dauerformen bildenden Mikroben, namentlich Bacillus amylobacter (in 4 Büchsen gefunden) in Betracht. Daneben konnte ich noch je zweimal Bacillus acidi lactici Hueppe und Bacillus brassicae acidae neben einigen unbekannten, in ihrem Wachstum coliähnlichen Organismen finden.

6. Der unter Nr. 25 beschriebene und wiederholt vorgefundene Bazillus scheint namentlich für Bohnen gefährlich zu sein.

7. Auffallend ist die immer vorhandene, wenn auch zuweilen geringe Steigerung des Säuregehaltes in bombierten Gemüsekonserven.

Während ich in guten, keimfreien Bohnen- und Erbsenbüchsen für 10 ccm der betreffenden Büchse eine Acidität von 0,95—1,30 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH finden konnte, variierte dieselbe in verdorbenen Büchsen der gleichen Gemüseart von 1,05—8,66 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH. Bemerkenswert ist die stärkere Säuerung in den Büchsen Nr. 12 und 16.

1) Vgl. Migula, System d. Bakt., II, S. 327.

8. Die jeweils mit der Brühe der Büchsen ausgeführten Tierversuche an Mäusen verliefen alle resultatlos. Allerdings müssen wir zugeben, dafs diese Versuche für das Auffinden von Krankheitserregern insofern nicht erschöpfend waren, als bei denselben nur Mäuse angewendet wurden, weil andere Tiere in der nötigen Anzahl nicht zur Disposition standen. Aber das Eine geht aus denselben hervor, dafs in den Büchsen der erwähnte, für Mäuse stark toxische Bacillus botulinus nicht enthalten war, was auch mit den Kulturversuchen übereinstimmt. Das Gleiche gilt von dem ebenfalls mäusepathogenen Proteus, der, wie eingangs erwähnt, u. a. als Ursache von Konservenvergiftung angesehen wurde.

Folgende Versuche haben den Zweck, die Frage zu studieren, ob genannte Mikroben in den in Betracht fallenden Konserven überhaupt zu gedeihen vermögen.

Bacillus botulinus und Proteus in Konservenbrühe.

Der als Erreger der Darmstädter Vergiftung angenommene Bacillus botulinus wurde, wie früher erwähnt, wieder angezweifelt[1]), indem Proteusarten als Ursache der Toxinbildung angesehen wurden.

Nach den bisherigen Beobachtungen ist der Bacillus botulinus gegen Säuren sehr empfindlich. Es mufste deshalb überraschen, dafs nach G. Landmann genannter Organismus auch auf Bohnenkonserven, also auf entschieden sauren Nährböden, Toxine bilde. Um diesen Widerspruch aufzuklären, führte ich folgende Versuche aus:

Der von Kràl bezogene Bacillus botulinus zeigte in seinem ganzen morphologischen wie auch biologischen Verhalten die gleichen Merkmale wie der von van Ermengen beschriebene[2]); nur hatte der Stamm, wie verschiedene Tierversuche gezeigt, die Eigenschaft verloren, auf glykosehaltigen Nährböden Toxine zu bilden. Da mir leider keine andere Kultur zur Verfügung stand, mufste ich mich auf die Frage beschränken, ob dieser

1) Konserven-Zeitung, Jahrg. 1904, Nr. 8.

2) Kolle-Wassermann, Handbuch d. pathogenen Mikroorganismen. 9. u. 10. Liefg., 1903, S. 637.

Bazillus in den genannten Substraten, die aus keimfreien Büchsen des Handels entnommen wurden, zu gedeihen vermag. Bei wiederholten, auch bei verschiedenen Temperaturen ausgeführten Versuchen konnte immer in Bouillon mit Traubenzucker, ebenso in Erbsenbrühe bei Einimpfung von Bacillus botulinus starke Trübung und Gasentwicklung mit Buttersäuregeruch konstatiert werden; in gleichzeitig beimpfter Bohnenbrühe war niemals Wachstum zu bemerken, obschon diese unter gleichen Bedingungen gehalten wurde. Auch im mikroskopischen Präparat war keine Vermehrung zu bemerken. Der allerdings nicht toxisch wirkende Stamm von Bacillus botulinus, mit dem diese Versuche gemacht, wuchs also in Bohnenbrühe nicht, wohl aber in Erbsenbrühe.

Wie erwähnt, prüfte ich auch das Verhalten von Bacillus proteus vulgaris auf diesen Nährböden. Die Kulturen wurden 6 Tage anaerob bei 22° gehalten.

In Traubenzuckerbouillon, in Erbsen- und Bohnenbrühe war ein üppiges Wachstum und Gasentwicklung zu verzeichnen. Auf all diesen Substraten bildeten sich kräftig wirkende Toxine, so dafs weifse Mäuse nach 1—3 Tagen daran zugrunde gingen bei subkutaner Injektion von 0,6—0,7 ccm der keimfrei filtrierten Flüssigkeit.

Lebensdauer der Bakterien, welche die Bombage verursachen.

Aus den bakteriologischen Untersuchungen ist ersichtlich, dafs es nur bei einzelnen bombierten Konservenbüchsen, trotz vielseitiger Versuche, nicht gelang, die Verderber zu züchten, obschon in den diesbezüglichen mikroskopischen Präparaten eine Menge solcher nachweisbar waren.

Dies konnte ich mir kaum anders erklären, als dafs die Organismen abgestorben waren. Sie haben sich wohl anfänglich in den schwach sauren Gemüsekonserven gut entwickelt, sind aber später mit zunehmendem Säuregrad in ihren eigenen Stoffwechselprodukten zugrunde gegangen.

Um dieser Frage näher zu treten, stellte ich folgende Versuche an: Bohnen oder Erbsen mit Kochsalz und Wasser in dem

in den Konserven vorkommenden Verhältnis versetzt, in Glasröhren in drei aufeinanderfolgenden Tagen je eine Stunde im Dampftopf sterilisiert und nachher nach den bekannten Methoden auf Keimfreiheit geprüft, wurden mit einigen aus Konserven isolierten Bakterien beimpft, die Röhren zugeschmolzen und längere Zeit bei Zimmertemperatur im Dunkeln sich selbst überlassen. Schon nach kurzer Zeit war in den erwähnten Glasröhren Wachstum und lebhafte Gasentwicklung im Innern zu bemerken.

Organismen aus den Büchsen Nr. 13, 18, 23 in der erwähnten Weise in Bohnen eingeimpft waren trotz kräftiger Gas- und Säurebildung nach fünf Monaten noch lebensfähig; zur Neutralisation der gebildeten Säure wurden pro 10 ccm Brühe: 3,57; 0,79; 3,49 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH verbraucht. Die ursprüngliche Säuerung einer gleich lang, ebenfalls eingeschmolzenen sterilen Probe betrug für 10 ccm 0,79 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Eine in gleicher Weise, mit dem aus Büchse 10 isolierten Organismen eingeimpfte, mit Erbsen beschickte Probe zeigte nach neun Monaten bei einer Säuerung von 9,82 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH pro 10 ccm Erbsenbrühe keine entwicklungsfähigen Bakterien mehr Doch liefsen sich solche in grofser Zahl durch das mikroskopische Präparat nachweisen. Versuche mit den aus Büchse Nr. 1 und 14 gefundenen Bazillen gaben nach acht resp. fünf Monaten noch Lebensfähigkeit.

Wohl möglich, dafs ich zu einem anderen Resultate gelangt wäre, wenn ich die Röhren noch länger sich selbst überlassen hätte, was mir aus äufseren Gründen nicht möglich war.

Immerhin ist durch den einen Versuch erwiesen, dafs Bakterien auch in Konserven in ihren eigenen Stoffwechselprodukten zugrunde gehen können Möglich wäre auch, dafs diejenige Bakterien, welche die Sterilisation in irgend welcher Art überstanden haben, oder solche, welche nachträglich von aufsen hineingelangt sind, sich erst dann in den Büchsen nicht

mehr entwickeln, wenn die zu ihrem Lebensunterhalte nötige Menge Sauerstoff aus der Luft, die doch immer in kleinen Mengen in den Dosen vorkommt, aufgezehrt ist.

Gasdruck bombierter Gemüsekonserven.

Bei meinen Untersuchungen fiel mir öfters der enorme Druck im Innern der Dosen auf, und ich entschlofs mich, denselben durch einige Messungen festzustellen.

Um den Gasdruck in bombierten Büchsen zu bestimmen, wurde an der betreffenden Dose in der Mitte des Deckels ein kurzes Messingröhrchen aufgelötet und darüber ein dickwandiges, möglichst kurzes, enges Gummischlauchstück (Vakuumschlauch) mittels Drahtligaturen gut befestigt. In das Rohr, resp. in den Schlauch wurde nun ein scharf zugespitzter, kurzer, oben mit einem Knopf versehener Stahlnagel hineingelegt und der ganze Schlauch mit Wasser gefüllt. Bei den ersten Versuchen wurde das Schlauchende mit einem Quetschhahn verschlossen und hierauf der Schlauch wenig umgebogen und mit der Hand fest auf den Nagelknopf gedrückt, so dafs die Spitze in die Blechdose eindrang und derart eine Verbindung mit dem Innern der Büchse und dem Schlauche herstellte. Zuerst wurde zur Druckmessung ein U-förmig gebogenes, langes, mit Quecksilber gefülltes Glasrohr angesetzt und der Quetschhahn geöffnet; sodann konnte durch Bestimmung der Niveaudifferenz der beiden Quecksilberkuppen der Gasdruck in mm Hg abgelesen werden. Wie aus untenstehender Tabelle ersichtlich, war der Druck manchmal so grofs, dafs diese Vorrichtung nicht zu gebrauchen war, daher verwendete ich in der Folge anstatt des U-Rohres ein Metallmanometer und stellte die Verbindung des Doseninnern mit dem Manometer in gleicher Weise her.

In untenstehender Zusammenstellung sind die erhaltenen Resultate in Atmosphären-Überdruck angegeben.

(Siehe die Tabelle auf S. 137.)

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich, ist der Druck in den verdorbenen Konserven manchmal ein enormer, und es braucht uns

nicht zu verwundern, wenn ein spontanes Platzen der Dosen vorkommt, wobei der Falz gewöhnlich aufgesprengt werden soll.

Gröfse der Büchse	Inhalt der Büchse	Druck in Atmosphären
1 Liter	Schwarzwurzeln	0,4 Atmosphären
1 »	Erbsen	0,2 »
1 »	Erbsen	0,3 »
1/2 »	Karotten	0,7 »
1 »	Bohnen	2,0 »
1/2 »	Erbsen	3,5 »
1 »	Erbsen	1,9 »
1/2 »	Bohnen	2,0 »
1 »	Erbsen	2,2 »
1 »	Erbsen	2,1 »

Prüfung des Büchsenmateriales auf Dichtigkeit.

Aus meinen früher erwähnten Untersuchungen ist zu entnehmen, dafs ein grofser Teil der Bombagen auf Undichtigkeit der betreffenden Dosen, die entweder schlecht gefalzt oder nachträglich gelitten, zurückzuführen ist. Um den Grund näher kennen zu lernen, untersuchte ich 30 Stück leere, beiderseitig verschlossene, neue Dosen verschiedener Gröfse ohne Inhalt, die mir in zuvorkommender Weise von mehreren Fabriken übermittelt worden waren, nach der früher erwähnten Evakuierung mit einer Wasserstrahlpumpe. Von diesen 30 derartig geprüften Büchsen waren vier Stück an der Übergangsstelle von Lötnat und Falz undicht.

Woher es kommt, dafs ein so hoher Prozentsatz ($13\frac{1}{3}\%$) von Dosen undicht war, kann ich mir nicht genau erklären. Vielleicht ist es einem Zufall zu verdanken, oder, was wahrscheinlicher ist und man mir auch seitens einer Fabrik nachträglich mitgeteilt hat, dafs man namentlich solche Büchsen vom Lager genommen hatte, bei denen am ehesten eine Möglichkeit einer späteren Undichtigkeit vermutet wurde.

Gestützt auf diesen Befund und namentlich auch darauf, dafs bei den bombierten Büchsen in sehr vielen Fällen die Ursache des Zerstörens auf Undichtigkeit zurückzuführen ist,

möchte ich die Frage aufwerfen, ob es vom ökonomischen Standpunkte aus nicht empfehlenswert wäre, die maschinellen Einrichtungen für das Falzen zu verbessern oder, wenn dies nicht möglich, diese verdächtige Stelle noch nach dem Falzen zu verlöten?

Chemische Zusammensetzung der Gase.

Diese Frage besitzt zwar kein praktisches, wohl aber wissenschaftliches Interesse. Daher entschlofs ich mich, eine Reihe diesbezüglicher Untersuchungen zu machen.

Dazu wurden mehr oder weniger stark bombierte Büchsen verwendet und die Gase nach der Methode von Hempel[1]) untersucht. Schwere Kohlenwasserstoffe und Methan konnten niemals gefunden werden. Der durch die Absorption erhaltene Gasrest wurde in der Explosionspipette verbrannt und die Kontraktion bestimmt.

Zusammensetzung der Gase in Prozenten.

Inhalt der Büchse	CO_2 in %	O in %	H in %	N in %
Bohnen . . . . stark bombiert	38,1	0,4	21,5	40,0
Erbsen . . . . wenig ›	69,8	—	—	30,2
Erbsen . . . . stark ›	81,8	0,1	—	18,1
Bohnen . . . . wenig ›	36,0	0,5	11,4	52,1
Erbsen u. Karotten, stark ›	72,6	0,7	—	26,7
Erbsen . . . schwach ›	70,8	0,8	—	28,4
Erbsen . . . sehr stark ›	21,3	0,3	60,3	18,1
Erbsen . . . . kräftig ›	68,6	—	21,2	10,2
Erbsen . . . . mäfsig ›	87,4	—	—	12,6
Erbsen . . . sehr stark ›	77,8	0,2	—	22,0
Bohnen . . . . mäfsig ›	32,5	0,7	20,0	46,8
Karotten . . . wenig ›	17,2	6,7	56,0	20,1
Bohnen . . sehr gering ›	34,4	0,5	5,0	60,1
Bohnen . . . schwach ›	21,7	0,5	5,3	72,5
Gemischte Gemüse, wenig ›	15,2	—	60,4	24,4
Spinat . . . schwach ›	12,8	0,8	45,1	41,3

1) Treadwell, F. P., Quantitative chemische Analyse, I. Aufl., S. 465.

Der Sauerstoff dürfte der bei dem Verschlufs der Büchsen zurückgebliebenen Luft entstammen, ebenso ein Teil des Stickstoffs. Der andere Teil des letzteren aber, sowie die Kohlensäure und der Wasserstoff, sind als Produkte der Bakterientätigkeit aufzufassen, durch welche auch ein Teil des ursprünglichen Luftsauerstoffs verbraucht wurde.

Maximaltemperatur in den Gemüsekonserven während der Sterilisation in den Autoklaven.

Zu wiederholten Malen war mir die zum Teil geringe Hitzebeständigkeit einzelner Mikroorganismen, die ich in bombierten, als dicht befundenen Gemüsekonservenbüchsen vorgefunden hatte, aufgefallen, und es stieg in mir die Vermutung auf, dafs unter Umständen die Temperatur in den Büchsen während der Sterilisation im Autoklaven nicht so hoch sei, wie man vermuten konnte. Um darüber klar zu werden, führte ich einige diesbezügliche Temperaturmessungen aus. (Bei diesen Versuchen möchte ich noch besonders darauf aufmerksam machen, dafs ich allerdings nur die Temperatur der die Gemüse umgebenden Flüssigkeit ermitteln konnte. Wie sich die Verhältnisse im Innern einer Bohnenhülse oder Erbse, wo doch auch Bakterien hineingelangen können, gestalten, konnte ich aus naheliegenden Gründen leider nicht ermitteln.)

Zu diesem Zwecke wurden eine Reihe kleiner, von 90—110°, bzw. 105—125° eingeteilter Maximalthermometer benutzt. Dieselben wurden so klein wie möglich angefertigt und hatten eine Länge von 5,5 cm und einen Durchmesser von 4—5 mm. Alle Thermometer waren vor dem Gebrauche auf ihre Richtigkeit genau geprüft worden.

Bei den Versuchen im Laboratorium wurde in dem Deckel der Büchse eine kleine Öffnung gemacht, das an einem Drahte befestigte Thermometer möglichst in die Mitte des Gemüses gesteckt und das Ganze wieder zugelötet.

Während der Versuche bestimmte ich jedesmal auch die die Büchsen umgebende Maximaltemperatur in dem Autoklaven während der Konservierung; zum Vergleiche wurde auch der

Druck, resp. die Temperatur am Manometer abgelesen und die Zeit genau eingehalten. In einem kleinen Autoklaven des Laboratoriums wurden folgene Zahlen erhalten, wenn die Luft vollständig durch ausströmenden Dampf verdrängt wurde:

Dauer 20 Minuten; Temperatur an der Temperaturskala des Manometers 117°, Temperatur am Maximalthermometer im Autoklaven 121,5°.

I.	½ l	Büchse	Bohnen	119,6°	Maximaltemperatur,
	½ l	»	Erbsen	120,2°	»
	1 l	»	Erbsen	119,2°	»
	½ l	»	Erbsen	119,6°	»

Diese überraschenden Zahlen waren durch die Kleinheit des Apparates bedingt, da, wie aus Versuchen hervorging, die Ausstrahlung der grofsen Metallmasse zu sehr in Betracht kam.

Bei den folgenden Messungen wurde ein gröfserer Autoklav, System Lautenschläger (innere Tiefe bis zur Wasseroberfläche 300 mm; innerer Diameter 250 mm), mit Manometerregulator versehen, benutzt. Auch hier wurde die Luft möglichst vollständig entfernt.

II. 20 Minuten 113° (Temperaturskala des Manometers).

1 l	Büchse	Erbsen	108,5°	Maximaltemperatur,
1 l	»	»	109,0°	»
1 l	»	»	109,1°	»
½ l	»	»	111,0°	»
½ l	»	»	110,5°	»
2 l	»	»	106,0°	»

Maximaltemperatur im Autoklaven 112,5°.

III. 20 Minuten 118° (Manometerablesung).

1 l	Büchse	Erbsen	113,7°	Maximaltemperatur.
1 l	»	gemischte Gemüse	113,2°	»
1 l	»	Erbsen	113,4°	»
2 l	»	»	110,8°	»
½ l	»	»	116,0°	»
½	»	»	115,8°	»

Die maximale Temperatur im Autoklaven betrug während des Prozesses, an zwei verschiedenen Stellen gemessen, übereinstimmend 117,5°.

IV. 15 Minuten 112° (Manometerablesung).

1 l	Büchse	Bohnen	108,0°	Maximaltemperatur,
1 l	»	Wachsbohnen	109,0°	»
1 l	»	feine Bohnen	107,5°	»
1 l	»	ganz feine Bohnen	106,8°	»
$^{1}/_{2}$ l	»	grobe Bohnen	111,0°	»
1 l	»	Erbsen	109,6°	»

Maximaltemperatur im Autoklaven 112,5°.

Diese auffallenden Verschiedenheiten lassen sich vielleicht dadurch erklären, dafs die Flüssigkeit bei den gröfseren, den groben Bohnen, wie z. B. den Wachsbohnen, besser zirkulieren kann wie bei den kleineren, wo die Zwischenräume viel enger sind.

V. 15 Minuten 109° (Manometerablesung).

1 l	Büchse	Bohnen	105,0°	Maximaltemperatur,
1 l	»	»	104,0°	»
1 l	»	Karotten	106,0°	»
$^{1}/_{2}$ l	»	Bohnen	107,0°	»

Maximaltemperatur im Autoklaven 109,5°.

VI. 15 Minuten 115° (Manometerablesung).

1 l	Büchse	Bohnen	111,0°	Maximaltemperatur.
1 l	»	»	109,9°	»
1 l	»	gelbe Rüben	112,2°	»
$^{1}/_{2}$ l	»	Bohnen	113,0°	»

Maximaltemperatur im Innern des Apparates 115,4°.

Durch das freundliche Entgegenkommen seitens der Direktion einer Konservenfabrik wurde es mir auch ermöglicht, einige Messungen in den von der Fabrik selbst benutzten Autoklaven auszuführen.

An den Thermometern wurde oben wieder ein Draht befestigt und dieser in der Mitte des Dosendeckels derart angelötet,

dafs der Draht und damit das Thermometer beim nachherigen Falzen durch die Maschine in die Mitte der Büchse zu liegen kam.

Es wurden hier folgende Versuche und Ablesungen an den Maximalthermometern gemacht:

VII. 20 Minuten 105° (Manometerablesung).
1 l Büchse Tomatenpüree 102,8° Maximaltemperatur in der Büchse,
1 l » Konfitüre 102,2° »
Maximaltemperatur im Autoklaven 110°.

VIII. 25 Minuten 112° (Manometerablesung).
1 l Büchse rote Kirschen 108°.
Maximaltemperatur im Autoklaven 113°.

IX. 20 Minuten 115° (Manometerablesung).
1 l Büchse Schwarzwurzeln 113,9°.
Maximaltemperatur im Apparat 120,0°.

X. 20 Minuten 117° (Manometerablesung).
1 l Büchse Bohnen 110,0° Maximaltemperatur,
1 l » Spinat 104,0° »
1 l » Erbsen 112,0° »
Maximaltemperatur im Autoklaven 119,0°.

Die Temperaturen im Innern des Autoklaven sind hier bei obigen Versuchen deshalb höher, wie diejenigen, welche denselben laut Manometerablesung entsprechen sollten, weil bei den Versuchen der betreffende Arbeiter in der Fabrik meinem Wunsche gemäfs den auf etwa 7—8 Atmosphären gespannten Dampf derart einströmen liefs, wie es gewöhnlich geschieht. Durch das zu rasche Einströmenlassen des Dampfes wurde das Thermometer im Autoklaven für ganz kurze Zeit einer höheren Temperatur ausgesetzt als diejenige, bei der in Wirklichkeit die Sterilisation erfolgte.

Bei den folgenden Versuchen liefs ich den Dampf vorsichtig einströmen.

XI. 20 Minuten 125° (Manometerablesung).
2 l Büchse Sauerkraut 106,5°.
Maximaltemperatur im Autoklaven 124,5°.

XII. 30 Minuten 105° (Manometerablesung).

5 l Büchse Tomatenpüree 105,0° Maximaltemperatur,
1/2 l » » 105,5° »

XIII. 60 Minuten 105° (Manometer).

5 l Büchse Äpfelmark 105,0°,
2 l » Erbsen 106,0°,
1/2 l » Äpfelmark 105,9°.
Maximaltemperatur im Apparate 106,5°.

XIV. 20 Minuten 117° (Manometerablesung).

1 l Büchse Kirschen 111,0° Maximaltemperatur,
1 l » Spinat 104,0° »
1 l » Erbsen 112,0° »
1 l » Bohnen 109,5° »
Maximaltemperatur im Autoklaven 117,9°.

Bemerkenswert sind die Zahlen in X, XI, XIV, welche uns zeigen, dafs Spinat und Sauerkraut schwer zu sterilisieren sind. Das dichte, kompakte Material verhindert offenbar einen raschen Ausgleich der Temperatur. Ich will noch besonders bemerken, dafs diese Temperaturen nur teilweise im Einklang mit den sonst von der Fabrik verwendeten stehen.

Von gröfster Wichtigkeit ist die Kenntnis der Geschwindigkeit, mit welcher die verschiedenen Konserven die umgebende Dampftemperatur im Autoklaven bis zu einem gewissen Grade annehmen.

Folgende Bestimmungen geben uns hierüber Aufschlufs:

1 l Büchse Erbsen gleicher Qualität erreichten 105,8° nach 5 Min.
1 l » » » » » 108,2° » 10 »
1 l » » » » » 111,9° » 15 »
1 l » » » » » 113,0° » 20 »

Die Temperatur, am Manometer entnommen, betrug bei diesen Versuchen 115°; diejenige im Innern des Autoklaven 115,5°.

1 l Büchse Bohnen erreichten 104,5° nach 5 Min.,
1 l » » » 107,5° » 10 »
1 l » » » 109,0° » 15 »

Die Maximaltemperatur am Manometer betrug 112°; diejenige im Innern des Autoklaven bei allen drei Versuchen 112,0°.

Heydenreich[1]) untersuchte diese Frage beim Wasser, indem er, in mit demselben gefüllte Glaskolben verschiedener Gröfse Maximalthermometer legte und das Ganze in den Dampftopf brachte. Nachher verglich er die Temperatur des in dem Deckel des Dampftopfes steckenden Thermometers mit demjenigen im Wasserkolben. Er fand:

für 120°

(Thermometer des Deckels des Dampfkessels)

$3^3/_4$ l	Wasser	erreichten	120° in wenig mehr als	15 Min.,
2 l	»	»	120° in ca.	15 »
1 l	»	»	120° zwischen	5—10 »
$^1/_2$ l	»	»	120° in wenig mehr als	2 »

für 110°

1 l	Wasser	erreichte	110°	zwischen	5 und	10	Min.,
$^1/_2$ l	»	»	110°	»	2 »	5	»
200 ccm	»	»	110°	»	2 »	5	»
100 ccm	»	»	110°	in ca.	2		»

Auch andere[2]) haben ähnliche Versuche angestellt.

Wie aus diesen Zahlen ersichtlich, nimmt Wasser in einem offenen Gefässe die Temperatur des umgebenden Dampfes verhältnismäfsig sehr rasch an, während es bei den in Büchsen liegenden Konserven viel länger geht. Es kommt offenbar das schlechte Wärmeleitungsvermögen des Gemüses und der behinderte Ausgleich durch Strömung der Flüssigkeit in der Büchse in Betracht.

---

1) Heydenreich, Sterilisation mittels des Dampfkochtopfes für bakteriologische Zwecke. Zeitschr. f. wissenschaftl. Mikroskopie und f. mikroskopische Technik. Bd. I, Heft 1, 1884; zit. nach Th. Christen, Dissert., Bern, 1895: Untersuchungen über die Dauer des Sterilisationsprozesses im gespannten Dampfe bei gegebenen fixen Temperaturen.

2) Koch, Rob., Gaffky, Löffler, Versuche über die Verwertbarkeit heifser Wasserdämpfe zu Desinfektionszwecken. Mitteilungen aus dem Kais. Gesundheitsamte, 1881, Bd. I, S. 322.

Sehr ungünstig gestalten sich die Verhältnisse, wenn man absichtlich Luft in dem Autoklaven läfst. Da auch dieser Faktor bei der Konservierung eine grofse Rolle spielt, so führte ich einige diesbezügliche Messungen aus. Die Luft wurde nicht aus den Apparaten entfernt.

20 Minuten 114° (Manometerablesung).

1 l	Büchse	Erbsen	103,5°	Maximaltemperatur in der Büchse,
½ l	»	»	105,5°	» » » »
1 l	»	Bohnen	103,0°	» » » »
½ l	»	»	104,5°	» » » »
1 l	»	Spinat	101,0°	» » » »

Die Maximaltemperatur im Autoklaven betrug in der Nähe des Deckels gemessen nur 100,0°, wohl wegen der Anwesenheit von Luft.

Der Einflufs der zurückgebliebenen Luft geht auch aus folgendem Versuche hervor, bei welchem im Innern des Apparates in verschiedene Höhenlagen Maximalthermometer angebracht wurden.

15 Minuten 118° (Manometerablesung).

Thermometer in der Nähe des Deckels	101,0°,
» » » Mitte des Autoklaven	105,5°,
» über der Wasseroberfläche	117,0°.

Die Einbufse, welche die Fabrikanten alljährlich durch das Verderben der Konserven erleiden, sind bei einem geordneten Betriebe gegenwärtig bedeutend zurückgedrängt, während man früher, wo die Arbeitsmethoden nicht so genau ausprobiert waren, mit viel gröfseren Verlusten rechnen mufste. Es konnte mitunter vorkommen, dafs ein ganzer Satz verdarb.

Als die hauptsächlichsten Gründe, die Bombagen von Konserven bewirken können, möchte ich, gestützt auf vorhergehende Versuche, resümierend folgende anführen[1]):

1. Die Temperaturen im Innern der Büchsen erreichen gelegentlich nicht die notwendige Höhe.

1) Vgl. auch v. Wahl, Konserven-Zeitung, Jahrg. 1903, Nr. 11.

Dies kann vorkommen:

a) Wenn zu wenig lang sterilisiert wird,

b) durch das Zurückbleiben von Luft, sowohl in dem Autoklaven als auch in den Büchsen.

Es ist daher dringend notwendig, die Luft aus den Autoklaven bei der Sterilisation vollständig ausströmen zu lassen und die Dosen möglichst mit Wasser zu füllen; denn die Luft erwärmt sich viel langsamer als Wasserdampf. Wenn sich nur an einer einzelnen Stelle der Büchse im Innern eine kühlere Luftinsel bildet, in der sich zufällig vereinzelte, auch nicht sehr hitzebeständige Sporen finden, so können sie den Sterilisationsprozefs überdauern, um sich dann nachher auf dem günstigen Nährboden zu vermehren und eine Zersetzung herbeizuführen.

2. Die Verderber können durch Undichtigkeit der Dosen von aufsen hereindringen, indem die Büchse schlecht gefalzt wurde oder nachträglich aus irgend einem Grunde gelitten hat.[1]) Solche Büchsen können dann trotz einer ursprünglich bestehenden Verbindung nach aufsen bombieren. Eine Ausgleichung des Druckes braucht nicht stattzufinden, indem eine winzig kleine Öffnung, welche den Verderbern als Eingangspforte gedient hat, nachträglich durch den Gummiring im Falz oder durch ein kleines Partikelchen des Gemüses ventilartig wieder verschlossen werden kann. Dafür spricht auch, dafs sehr häufig aus bombierten Büchsen kleine Mengen des Gemüseinhaltes aussickern. Auch ist ein nachträglicher Verschlufs durch Zurostung der Büchse denkbar.

Eine solche nachträgliche Infektion wird bei undichten Büchsen u. a. dadurch begünstigt, dafs die den Autoklaven verlassenden Konserven zur Abkühlung in Wasser untergetaucht werden, welches wiederholt zu diesem Zwecke

1) Vgl. auch Pfuhl, E., Über die Entstehung, Erkennung und Behandlung undichter Fleischkonservenbüchsen. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankheiten, Bd. 50, Heft 2, 19. Mai 1905, S. 317.

gebraucht wird und deshalb eine gröfsere Zahl von Bakterien beherbergt. Undichte Dosen können solches verunreinigtes Wasser aspirieren, wodurch dann ebenfalls eine Bombage zustande kommen kann. Hier wird es sich wohl meist um Saprophyten handeln, doch ist die Infektion mit pathogenen Keimen nicht ausgeschlossen, namentlich aber können Toxinbildner auch auf diesem Wege in die Konserven gelangen.

Es ist hier zu empfehlen, möglichst gutes, einwandfreies Brunnenwasser zur Abkühlung anzuwenden und dasselbe tunlichst häufig zu wechseln, wodurch die Gefahr einer nachträglichen Einwanderung von Mikroorganismen irgend welcher Art herabgemindert wird.

3. In vielen Fällen spielt sicherlich auch die grofse Widerstandsfähigkeit der Mikroben gegen hohe Temperaturen eine Rolle. Allerdings konnten von anderen und auch von mir aus verdorbenen Gemüsekonserven keine Mikroben isoliert werden, die die oben angeführten Temperaturen aushalten.

Es ist bekannt, dafs Erbsen schwieriger zu konservieren sind als Bohnen. Obschon man erstere viel höher und länger sterilisiert, bombiert ein gröfserer Prozentsatz. Diese Verschiedenheit ist vielleicht in der chemischen Zusammensetzung der betreffenden Gemüse zu suchen. So ist es beispielsweise nicht unmöglich, dafs der stärkere Säuregehalt bei Bohnen auch das Sterilisieren erleichtert oder nachträglich wachstumshemmend wirkt. Aufser der Säure kommen in den Gemüsen noch andere Bestandteile in Betracht, die einen Einflufs auf Organismen haben können, so scheinen z. B. Karotten eine solche entwicklungshemmende Substanz zu enthalten, da sie leicht steril zu erhalten sind.

Zum Schlusse möchte ich noch darauf aufmerksam machen, dafs es, um Vorgängen wie in Darmstadt tunlichst entgegenzutreten, ratsam ist, Konservennahrung nur nach nochmaligem

Aufkochen zu genießen und alle solche Büchsen, welche beim Öffnen die geringste Spur einer Zersetzung zeigen, unschädlich zu machen mit Rücksicht darauf, daß die Möglichkeit der Anwesenheit von Toxinen oder pathogenen Keimen nicht ausgeschlossen ist.

Bombierte Büchsen sind auch noch aus dem Grunde vom Handel auszuschließen, weil bei ihnen gewöhnlich eine starke Säuerung auftritt und nach Lehmann[1]) die durch die Gärung gebildeten Säuren die Lösung des Zinns erleichtern und so unter Umständen zu Zinnvergiftungen führen können.

1) Lehmann, K. B., Untersuchungen über die hygien. Bedeutung des Zinns, insbesondere in Konserven. Archiv f. Hygiene, Bd. 45, Jahrg. 1902 S. 88—116. — Praktische Hygiene, S. 445.

(Aus dem Hygienischen Institut der deutschen Universität in Prag.
Vorstand: Prof. Hueppe.)

Die schützenden Eigenschaften des Blutes von aggressin-immunen Hühnercholeratieren.

Von

Dr. **Edmund Weil**,
Assistenten des Institutes.

Ausgeführt mit Unterstützung der Gesellschaft zur Förderung deutscher Wissenschaft, Kunst und Literatur in Böhmen.

Schon die Erzeugung der aktiven Immunität bei den Erregern der von Hueppe so benannten hämorrhagischen Septikämie stiefs auf grofse Schwierigkeiten. Die Pasteursche Methode mit abgeschwächten Kulturen (Vaccins) war sehr mangelhaft. Voges, der in der bakteriziden Aera mit toten Bakterien Immunität zu erzielen suchte, hatte nur Mifserfolge. Bessere Resultate hatte Kitt, worauf schon in einer früheren Arbeit hingewiesen wurde. Daselbst konnte auch gezeigt werden, auf welch einfache und sichere Weise es gelingt, hohe und dauernde aktive Immunität beim gefährlichsten Erreger der hämorrhagischen Septikämie, beim Hühnercholerabazillus, zu erzeugen, wenn man die Immunisierung nach einer Methode vornimmt, die auf der Grundlage der Bailschen Aggressintheorie basiert, nämlich durch Behandlung mit aggressinhaltigem Exsudat. Es sei hier nachgetragen, dafs der Schutz, den die aktive Immunität verleiht, soweit bisher festgestellt werden konnte, auf mindestens 3 Monate anhält, indem ein Kaninchen, das vor dieser Zeit die letzte

Exsudatinjektion erhalten hatte, die enorme Menge von 1 ccm virulenter Bouillonkultur reaktionslos vertrug[1]).

Was die passive Immunität anlangt, mit der sich die nachfolgenden Untersuchungen hauptsächlich beschäftigen, so können wir sagen, dafs ein sicher schützendes Immunserum bei Hühnercholera bisher überhaupt nicht existiert. Voges konnte bei seinen Tieren nie eine spezifische Eigenschaft im Blute auffinden; die Schutzwirkung, die er mit dem Blute seiner behandelten Tiere erzielte, verlieh auch das Serum von normalen Tieren; aufserdem bezog sich der Schutz auf Meerschweinchen, die gegen die Erreger der hämmorrhagischen Septikämie natürliche Resistenz besitzen. Seine Untersuchungsergebnisse fafst er folgendermafsen zusammen: »Mithin ist das einzige positive Resultat dieser unendlichen Bemühungen die Erkenntnis von der Unmöglichkeit spezifischer Wirkung der Sera von Tieren, die wir mit den Bakterien der hämmorrhagischen Septikämie zu immunisieren versucht haben.«

Die in neuerer Zeit hergestellten Immunsera von Jefs und Piorkowski, von Niebel und Hoffmann, ferner von Schreiber verliehen, wie die Nachprüfungen ergeben haben, keinen genügenden Schutz. Die nach der Kittschen Methode immunisierten Tiere liefern, wie der Autor berichtet, ein Serum, welches in allerdings hohen Dosen Schutz verleiht. Lignières konnte ein Serum von sicherer Wirksamkeit nicht erzeugen. Leclainche und Nocard konnten bei Mäusen und Kaninchen durch Serumbehandlung lediglich eine Lebensverlängerung erzielen, wirklicher Schutz trat nicht auf. Wir sehen, dafs die grofsen Schwierigkeiten, ein wirksames Serum gegen die Erreger der Hühnercholera zu erzielen, bisher nicht überwunden sind.

Die sicheren Resultate, welche die aktive Immunisierung gegen Hühnercholera ergeben hatte, liefsen erwarten, dafs das Blut der mit aggressivem Exsudat behandelten Tiere Schutz verleihende Stoffe enthalten würde. Konnte schon Bail bei Milzbrand durch Behandlung mit aggressinhaltigem Ödem ein Serum erlangen,

1) Siehe Wiener klin. Wochenschr., 1905, Nr. 16.

das die bisher bekannten an Wirksamkeit weit übertrifft, so mufste gewissermafsen die Hühnercholera, bei der wir über ein sicher wirkendes Immunserum überhaupt nicht verfügen, einen Prüfstein abgeben für den Wert dieser neuen Methode.

Es wurden, da sich behufs Serumgewinnung an gröfseren Tieren vorläufig äufsere Schwierigkeiten in den Weg stellten, ausschliefslich Kaninchen verwendet. Sterilisiertes Exsudat vertrugen dieselben selbst in gröfsten Mengen reaktionslos. Infiltrate, welche auftreten, beruhen stets darauf, dafs das Exsudat noch gröfsere Mengen toter Bakterien enthält und lassen sich mit Sicherheit vermeiden, wenn dieselben durch Zentrifugieren entfernt sind. Die Behandlung mit Exsudat ist sehr einfach, und die Immunität wird, wie aus beifolgendem Beispiele zu ersehen ist, auf folgende Weise hochgetrieben.

Kaninchen IV.

20. XI. 04.	$^1/_2$ ccm sterilisiertes Kaninchenexsudat subkutan . .	1975 g
27. XI. 04.	$1^1/_2$ ccm › › ›	2050 ›
3. XII. 04.	3 ccm › › ›	2115 ›
14. XII 04.	$^1/_{10}$ Öse Hühnercholerabazillen subkutan (zur Prüfung der Immunität)	2140 ›
6. I. 05.	5 ccm sterilisiertes Exsudat subkutan	2150 ›
19. I. 05.	Blutentnahme aus der Jugularis externa. (Schützt in Dosen von 1 ccm Kaninchen.)	
4. II. 05.	8 ccm sterilisiertes Exsudat subkutan	2150 ›
10. II. 05.	10 ccm › › ›	2270 ›
7. III. 05.	15 ccm › › ›	2350 ›
30. III. 05.	20 ccm › › ›	2550 ›
17. IV. 05.	Blutentnahme von 25 ccm aus der Jugularis externa (Schützt Mäuse in der Dosis von $^1/_{10}$ ccm, Kaninchen $^1/_2$ ccm)	2450 ›
22. IV. 05.	30 ccm sterilisiertes Exsudat subkutan	2500 ›
10. V. 05.	40 ccm › › ›	2400 ›
8. VI. 05.	Entblutet (mit diesem Serum wurden die letzten Versuche angestellt.)	

Alle hier zur Verwendung gelangten Immunsera stammten von Kaninchen, zu deren Immunisierung Exsudate verwendet wurden, welche mit dem Stamm »Prag« erzeugt waren. Wir verfügen über drei Stämme von Hühnercholerabakterien: den Stamm »Prag«, der durch mehr als 100 Kaninchenpassagen eine

ungeheuere Pathogenität für Kaninchen erlangt hatte, dieselbe aber in hohem Maſse für Mäuse und Vögel beibehalten hatte; den Stamm »Teplitz«, welcher frisch aus einem Huhn gezüchtet war, ebenfalls von hoher Pathogenität, welcher aber, wie aus verschiedenen Umständen zu ersehen ist, dem Stamm »Prag« nachsteht, und den Stamm »München«, von Professor Kitt in liebenswürdigster Weise dem Institut überlassen, welcher die Mitte zwischen Stamm »Prag« und »Teplitz« hält. Jedenfalls haben wir es mit drei Stämmen zu tun, welche in bezug auf Infektiosität nichts zu wünschen übrig lassen, indem Kaninchen, Mäuse und Vögel bei jeder Impfart mit ans Fabelhafte grenzenden geringen Mengen in kürzester Zeit septikämisch starben. Zur Immunitätsprüfung wurden nur die empfindlichsten Tiere, Kaninchen, Mäuse und Vögel verwendet, von welchen die ersten den höchsten Rang einnehmen. Wir können uns nicht vorstellen, daſs ein Tier gegen einen Infektionserreger eine höhere Empfänglichkeit aufweisen kann als das Kaninchen gegen den Hühnercholerabazillus.

Es wurde zu diesen Untersuchungen das Immunserum von vier Kaninchen verwendet, welche nach obigem Schema mit sterilisiertem Pleuraexsudat von intrapleural infizierten Kaninchen behandelt waren: Kaninchen IV, Kaninchen VIII, Kaninchen VII und Kaninchen VI. Es seien im folgenden die Versuchsprotokolle der Immunitätsergebnisse bei weiſsen Mäusen mitgeteilt, welche, wie erwähnt, hohe Empfänglichkeit gegen die Bakterien der Geflügelcholera besitzen. Das Immunserum wurde am Abend, die Bakterien am folgenden Morgen eingespritzt, weil für eine praktische Verwertung dieser Methode nur eine solche Anwendungsweise von Vorteil sein konnte. Sowohl Immunserum als auch Bazillen wurden unter die Haut des Rückens injiziert. Die Infektion mit $^1/_{10}$ Tropfen wurde so vorgenommen, daſs 1 Tropfen Bouillonkultur in 1 ccm NaCl aufgeschwemmt und davon $^1/_{10}$ ccm eingespritzt wurde.

Das zu den folgenden Versuchen verwendete Immunserum stammte von Kaninchen IV, welches durch acht Injektionen 63 ccm Exsudat bekommen hatte.

Infektion mit Stamm „Prag".

Maus a (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan; nach 12 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach genau 24 Stunden. Im Herzblute mikroskopisch massenhaft Bazillen.

Maus b. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 12 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus c. $^1/_2$ ccm Immunserum subkutan; nach 12 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus d. $^1/_{10}$ ccm Immunserum subkutan; nach 12 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Infektion mit Stamm „Teplitz".

Maus a (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan; nach 12 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt früher als in 19 Stunden. Im Herzblut mikroskopisch massenhaft Bazillen.

Maus b. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 12 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus c. $^1/_2$ ccm Immunserum subkutan; nach 12 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus d. $^1/_{10}$ ccm Immunserum subkutan; nach 12 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Infektion mit Stamm „München".

Maus a (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan; nach 12 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt früher als in 19 Stunden. Im Herzblut mikroskopisch massenhaft Bazillen.

Maus b. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 12 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus c. $^1/_2$ ccm Immunserum subkutan; nach 12 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus d. $^1/_{10}$ ccm Immunserum subkutan; nach 12 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Das Immunserum für diese Versuche lieferte Kaninchen VIII, welches durch fünf Injektionen 58 ccm Exsudat erhalten hatte.

Infektion mit Stamm „Prag".

Maus a (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach weniger als 18 Stunden. An der Infektionsstelle schmieriges Infiltrat, darin mikroskopisch massenhaft Bazillen. Herzblut wimmelnd von Bazillen.

Maus b. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus c. $^1/_2$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus d. $^1/_{10}$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Infektion mit Stamm „Teplitz".

Maus a (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach weniger als 18 Stunden. An der Infektionsstelle graues, schmieriges Infiltrat, im Aufstrich von demselben massenhaft Bazillen. Im Herzblut mikroskopisch massenhaft Bazillen.

Maus b. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus c. $^1/_2$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus d. $^1/_{10}$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Infektion mit Stamm „München".

Maus a (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach 24 Stunden. An der Infektionsstelle im Infiltrat mikroskopisch massenhaft Bazillen. Herzblut wimmelnd von Bazillen.

Maus b. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus c. $^1/_2$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus d. $^1/_{10}$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Das Immunserum zu dem folgenden Versuche stammte von Kaninchen VII, welches durch acht Injektionen 57 ccm Exsudat erhalten hatte.

Infektion mit Stamm „Prag".

Maus a (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach weniger als 18 Stunden. Im Infiltrate an der Infektionsstelle und im Herzblute mikroskopisch massenhaft Bazillen.

Maus b. $^3/_4$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus c. $^1/_2$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus d. $^1/_{10}$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Infektion mit Stamm „Teplitz".

Maus a (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach weniger als 18 Stunden. Im Herzblute und im Infiltrate mikroskopisch massenhaft Bazillen.

Maus b. $^3/_4$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus c. $^1/_2$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus d. $^1/_{10}$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Infektion mit Stamm „München".

Maus a (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach 22 Stunden. Im Herzblute und im Infiltrate an der Infektionsstelle mikroskopisch massenhaft Bazillen.

Maus b. $^3/_4$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus c. $^1/_2$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus d. $^1/_{10}$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. (An der Schwanzwurzel im Glase eingeklemmt in der Frühe — nach weniger als 18 Stunden — tot aufgefunden. Im Herzblute und im Infiltrate massenhaft Bazillen).

Die Immunisierung in dem folgenden Versuche wurde mit dem Blutserum von Kaninchen VI ausgeführt, welches durch sechs Injektionen 49 ccm Exsudat erhalten hatte.

Infektion mit Stamm „Prag".

Maus a (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan: nach 14 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach weniger als 18 Stunden. Im Infiltrate der Infektionsstelle und im Herzblute mikroskopisch massenhaft Bazillen.

Maus b. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 14 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus c. $^1/_2$ ccm Immunserum subkutan; nach 14 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus d. $^1/_{10}$ ccm Immunserum subkutan; nach 14 Stunden $^1/_{10}$ ccm Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Infektion mit Stamm „Teplitz".

Maus a (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan; nach 14 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach weniger als 18 Stunden. An der Infektionsstelle und im Herzblute mikroskopisch massenhaft Bazillen.

Maus b. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 14 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus c. $^1/_2$ ccm Immunserum subkutan; nach 14 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus d. $^1/_{10}$ ccm Immunserum subkutan; nach 14 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Infektion mit Stamm „München".

Maus a (Kontrolle) 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan; nach 14 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach weniger als 18 Stunden. Im Herzblute und an der Infektionsstelle mikroskopisch massenhaft Bazillen.

Maus b. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 14 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus c. $^1/_2$ ccm Immunserum subkutan; nach 14 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus d. $^1/_{10}$ ccm Immunserum subkutan; nach 14 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Wir entnehmen aus diesen Versuchen in übereinstimmender Weise, dafs alle hier zur Verwendung gelangten Immunsera in Mengen von $^1/_{10}$ ccm Mäuse schützen gegen eine die Kontrolltiere in weniger als 24 Stunden tötende Bakteriendosis. Bei sämtlichen Kontrolltieren wurde stets die dem Immunserum entsprechende Menge normales Serum gegeben, weil Voges gerade bei den Bakterien der hämorrhagischen Septikämie die Beobachtung gemacht hatte, dafs normale Sera von verschiedenen Tieren Resistenzerhöhung verursachen. Es darf jedoch nicht übersehen werden, dafs Voges mit Meerschweinchen arbeitete, welche gegen die hämorrhagische Septikämie natürliche Resistenz besitzen, worauf auch Kitt hinweist, ferner dafs Voges als Infektionsort die Peritonealhöhle wählte, wo eine nicht spezifische künstlich erzeugte Resistenz stets am stärksten ausgesprochen ist. Bei unseren Versuchen, weder bei Mäusen noch bei Kaninchen und Vögeln, wo bei den Kontrolltieren stets normales Serum injiziert wurde, konnte nie eine Spur jener Resistenzerhöhung beobachtet werden, wie aus diesen und den folgenden Versuchen ersichtlich ist. Vielleicht ist dies darauf zurückzuführen, dafs als Infektionsort die Subcutis gewählt wurde, oder darauf, dafs die hohe Pathogenität der hier verwendeten Stämme oder das natürlich empfängliche Tier dabei eine Rolle spielt. Das soll jedoch nicht entschieden werden.

Nach der Infektion zeigen die Mäuse kurze Zeit — einen Tag — geringe Krankheitserscheinungen, es tritt auch manchmal an der Infektionsstelle eine geringe Infiltration auf, welche jedoch rasch schwindet. Alle hier verwendeten Mäuse wurden mindestens drei Wochen beobachtet, damit sicher festgestellt werden konnte, ob der Schutz nicht vielleicht nur in einer Lebensverlängerung besteht. Auch entnimmt man aus diesen Versuchen, dafs Unterschiede im Sinne einer Polyvalenz nicht bestehen, denn in bezug auf die drei hier verwendeten Stämme liefs sich eine solche nicht feststellen, und es ist auch, wie wir aus dem folgenden ersehen werden, eine solche nicht anzunehmen.

Nun folgen die Immunisierungsversuche mit Kaninchen, auf deren hohe Empfänglichkeit schon hingewiesen wurde. Zu den folgenden Versuchen wurden ausschliefslich junge bis 800 g schwere Kaninchen verwendet, welche den höchsten Grad der Empfindlichkeit darstellen. Auch bei diesen Versuchen wurde die Serumbehandlung am Abend vor der Infektion vorgenommen. Serum- und Bakterieneinspritzung wurde an verschiedenen Körperstellen ausgeführt. Zur Immunitätsprüfung wurden die Sera der vier gennannten Kaninchen verwendet und zur Infektion dienten die drei zur Verfügung stehenden Stämme.

Das zu den folgenden Versuchen verwendete Immunserum stammte von Kaninchen VI.

Infektion mit Stamm „Prag“.

Kaninchen I. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 24 Stunden haselnufsgrofses Infiltrat. Nach 1 Woche Infiltrat nekrotisch. Nach 14 Tagen Infiltrat verschwunden. Lebt.

Kaninchen II. $^1/_2$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 24 Stunden flaches, talergrofses Infiltrat. Nach 6 Tagen gestorben. An der Infektionsstelle ausgedehntes, zum Teil nekrotisches Infiltrat, am Rand desselben frisches Ödem. Im Herzblut mikroskopisch vereinzelte Bazillen.

Infektion mit Stamm „Teplitz“.

Kaninchen I. 1 ccm Immunserum subuktan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Schon am Tage der Infektion deutlich krank. Nach 24 Stunden erbsengrofses Infiltrat. Stirbt nach 3 Tagen. Eitrige Pleuritis und Perikarditis (Seuche).

Kaninchen II. $^{1}/_{2}$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^{1}/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur, subkutan. Nach 24 Stunden erbsengrofses Infiltrat. Nach 1 Woche verflachtes, hellergrofses, nekrotisches Infiltrat. Nach 14 Tagen Infiltrat verschwunden. Lebt.

Infektion mit Stamm „München".

Kaninchen I. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^{1}/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 24 Stunden haselnufsgrofses Infiltrat. Nach 8 Tage Infiltrat nekrotisch. Nach 2 Wochen Infiltrat verschwunden. Lebt.

Kaninchen II $^{1}/_{2}$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^{1}/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach 48 Stunden. In der Bauchhöhle dicker Eiter, darin mikroskopisch Stäbchen, Fäden und Hefen. (Wahrscheinlich intraperitoneal infiziert und Darm angestochen. An der Infektionsstelle subkutan keine Erscheinungen.

Die sicher schützende Dosis dieses Immunserums beträgt 1 ccm. $^{1}/_{2}$ ccm Immunserum hat, wie aus Kaninchen II »Prag« zu ersehen ist, lediglich eine sechstägige Lebensverlängerung zur Folge. Kaninchen I »Teplitz« erlag der Kaninchenseuche (chronische Hühnercholera in der Form der Pyämie ist hier sicher auszuschliefsen), welche leider das ganze Jahr unter den jungen Kaninchen in unseren Ställen wütet, und gerade zu der Zeit, als diese Versuche ausgeführt wurden, im Rückgange war; sonst wäre ein Arbeiten mit jungen Kaninchen, die lange Zeit beobachtet werden mufsten, überhaupt unausführbar gewesen. Kaninchen II »München« ist wahrscheinlich ein unglücklicher Zufall.

Das Immunserum für die folgenden Versuche lieferte Kaninchen IV.

Infektion mit Stamm „Prag".

Kaninchen I. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^{1}/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 2 Tagen starken Nasenflufs. Stirbt nach 5 Tagen. Eitrige Rhinitis (Seuche). An der Infektionsstelle scharf begrenztes, zum Teil nekrotisches Infiltrat. Darin mikroskopisch Bazillen. Im Herzblut mikroskopisch keine Bazillen. Herzblut kulturell steril.

Kaninchen II. $^{1}/_{2}$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^{1}/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 2 Tagen erbsengrofses Infiltrat. Nach 4 Tagen Infiltrat talergrofs, hart. Nach 1 Woche Infiltrat nekrotisch. Nach 14 Tagen Infiltrat verschwunden. Lebt.

Infektion mit Stamm „Teplitz".

Kaninchen I. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^{1}/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 2 Tagen erbsengrofses Infiltrat. Nach

8 Tagen Infiltrat nekrotisch. Nach 2 Wochen Infiltrat verschwunden. Lebt.

Kaninchen II. $^{1}/_{2}$ ccm Immunserum subkutan: nach 16 Stunden $^{1}/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 48 Stunden erbsengrofses Infiltrat. Nach 1 Woche Infiltrat nekrotisch. Nach 14 Tagen Infiltrat verschwunden. Lebt.

Infektion mit Stamm „München".

Kaninchen I. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^{1}/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 2 Tagen haselnufsgrofses Infiltrat. Nach 1 Woche Infiltrat nekrotisch. Nach 2 Wochen Infiltrat verschwunden. Lebt.

Kaninchen II. $^{1}/_{2}$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^{1}/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 2 Tagen Infiltrat haselnufsgrofs. Nach 1 Woche Infiltrat nekrotisch. Nach 2 Wochen Infiltrat verschwunden. Lebt.

Das Immunserum dieses Kaninchens schützt sicher in der Dosis von $^{1}/_{2}$ ccm. Kaninchen I »Prag« hatte die Infektion mit Hühnercholera vollständig überwunden, wie aus dem sterilen Herzblutbefund hervorgeht, und wurde ein Opfer der Kaninchenseuche. (Eitrige Rhinitis.)

Für die folgenden Versuche wurde das Immunserum von Kaninchen VII verwendet.

Infektion mit Stamm „Prag".

Kaninchen III. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^{1}/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 2 Tagen walnufsgrofses Infiltrat. Nach 1 Woche Infiltrat nekrotisch. Nach 2 Wochen Infiltrat verschwunden. Lebt.

Kaninchen II. $^{1}/_{2}$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^{1}/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 2 Tagen Infiltrat walnufsgrofs. Nach 5 Tagen Infiltrat verflacht, handtellergrofs. Nach 10 Tagen beginnt es nekrotisch zu werden. Nach 14 Tagen vollständig nekrotisch. Nach 3 Wochen verschwunden. Lebt.

Infektion mit Stamm „Teplitz".

Kaninchen I. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^{1}/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 5 Tagen erbsengrofses Infiltrat. Nach 1 Woche vollständig nekrotisch. Nach 14 Tagen verschwunden. Lebt.

Kaninchen II. $^{1}/_{2}$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^{1}/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 2 Tagen erbsengrofses Infiltrat. Nach 1 Woche Infiltrat nekrotisch. Nach 14 Tagen verschwunden. Lebt.

Infektion mit Stamm „München".

Kaninchen I. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^{1}/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 5 Tagen hellergrofses, flaches Infiltrat. Nach 8 Tagen Infiltrat nekrotisch. Nach 14 Tagen verschwunden. Lebt.

Kaninchen II. $^1/_2$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 5 Tagen talergrofses Infiltrat. Nach 8 Tagen Infiltrat nekrotisch. Nach 14 Tagen Infiltrat verschwunden. Lebt.

Da die vorangehenden Kaninchenversuche gleichzeitig ausgeführt wurden, so ergab sich nur die Notwendigkeit, je ein Kontrolltier für jeden Stamm zu verwenden. Kontrolltiere wären jedoch für solche Versuche vollständig überflüssig. Die Infektion wurde hier mit der halben Bakterienmenge vorgenommen.

Infektion mit Stamm „Prag".

Kaninchen I (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{20}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach 12 Stunden. An der Infektionsstelle geringes Ödem. Mikroskopisch im Aufstrich von demselben massenhaft Bazillen. Im Herzblut mikroskopisch massenhaft Bazillen. In der Brusthöhle klare Flüssigkeit.

Infektion mit Stamm „Teplitz".

Kaninchen II (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{20}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach weniger als 20 Stunden. An der Infektionsstelle geringes, blutiges Ödem, darin mikroskopisch massenhaft Bazillen. Im Herzblut mikroskopisch wimmelnd von Bazillen. In der Pleura- und Peritonealhöhle klare Flüssigkeit.

Infektion mit Stamm „München".

Kaninchen III (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{20}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach weniger als 20 Stunden. An der Infektionsstelle geringe Reaktion, etwas Ödem, darin mikroskopisch massenhaft Bazillen. Im Herzblut mikroskopisch massenhaft Bazillen. In der Brusthöhle klares Transsudat.

Das Immunserum zu dem folgenden Versuche lieferte Kaninchen VIII.

Infektion mit Stamm „Prag".

Kaninchen I (Kontrolle). 1 ccm normales Schafserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt in weniger als 16 Stunden. An der Infektionsstelle diffusses ödematöses Infiltrat. Darin und im Herzblute mikroskopisch enorme Mengen Bazillen.

Kaninchen II. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 24 Stunden erbsengrofses Infiltrat. Nach 2 Tagen Infiltrat haselnufsgrofs. Nach 5 Tagen Infiltrat walnufsgrofs, verhärtet. Nach 14 Tagen Infiltrat derb, nekrotisch, käsigen Eiter entleerend. Nach 3 Wochen Infiltrat verschwunden. Lebt.

Kaninchen III. $^1/_2$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 24 Stunden erbsengrofses Infiltrat.

Nach 2 Tagen Infiltrat vergröſsert, doch scharf von der Umgebung abgegrenzt. Nach 8 Tagen Infiltrat von der Gröſse eines kindlichen Handtellers, flach, derb. Nach 14 Tagen Infiltrat nekrotisch. Nach 3 Wochen Infiltrat verschwunden. Lebt.

Infektion mit Stamm „Teplitz".

Kaninchen I (Kontrolle) 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach weniger als 16 Stunden. An der Infektionsstelle fast keine Reaktion. Im Aufstrich von der Infektionsstelle mikroskopisch massenhaft Bazillen, ebenfalls mikroskopisch im Herzblute.

Kaninchen II. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 24 Stunden erbsengroſses, scharf abgegrenztes Infiltrat. Nach 2 Tagen Infiltrat hart. Nach 8 Tagen Infiltrat nekrotisch. Nach 14 Tagen Infiltrat verschwunden. Lebt.

Kaninchen III. $^1/_2$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 24 Stunden Infiltrat walnuſsgroſs. Nach 8 Tagen Infiltrat nekrotisch. Nach 2 Wochen Infiltrat verschwunden. Lebt.

Infektion mit Stamm „München".

Kaninchen I (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach 20 Stunden. An der Infektionsstelle diffuses Ödem. Darin und im Herzblute mikroskopisch massenhaft Bazillen. In der Brusthöhle klare Flüssigkeit.

Kaninchen II. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 24 Stunden erbsengroſses Infiltrat. Nach 48 Stunden Infiltrat walnuſsgroſs; beginnt am oberen Ende sich zu verhärten. Nach 8 Tagen Infiltrat ganz hart, beginnt nekrotisch zu werden. Nach 14 Tagen Infiltrat nekrotisch. Nach 3 Wochen Infiltrat verschwunden. Lebt.

Kaninchen III. $^1/_2$ ccm Immunserum subkutan; nach 16 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 24 Stunden bohnengroſses Infiltrat. Nach 8 Tagen Infiltrat flach, handtellergroſs, derb, hart. Nach 14 Tagen Infiltrat nekrotisch. Nach 3 Wochen Infiltrat verschwunden. Lebt.

Wir entnehmen aus diesen Versuchsprotokollen, daſs die hier verwendeten Immunsera Kaninchen in der Dosis von $^1/_2$ ccm sicher schützen, gegen eine Bakterienmenge, welche die Kontrolltiere in weniger als 20 Stunden tötet. Die immunisierten Tiere reagieren auf die Infektion mit der Ausbildung von Infiltraten, die sich im Laufe der ersten Tage vergröſsern, dann stationär bleiben, sich verhärten und schlieſslich nekrotisch werden. Solange letzterer Umstand nicht eingetreten ist, sind die Tiere noch

in Gefahr, das Leben zu verlieren. (Kaninchen II »Prag«. S. 157.) Das nekrotische Infiltrat jedoch wird rasch resorbiert und die Tiere, die manchmal unter dem Einflufs der Infiltrate zu leiden haben, erholen sich dann rasch. Man mufs, um von der sicheren Wirkung des Immunserums überzeugt zu sein, die Tiere so lange in Beobachtung halten, als das Infiltrat nekrotisch zu werden beginnt. Die Kaninchen dieser Versuche wurden mindestens drei Wochen und länger beobachtet.

Von den drei Bakterienstämmen setzt die geringsten Veränderungen der Stamm »Teplitz«. Die Infiltrate bei den immunisierten Tieren erreichen nie eine nennenswerte Gröfse und schwinden rasch. Am stärksten sind die Infiltrate auffallenderweise beim Stamm »Prag« ausgebildet, gegen den die Tiere immunisiert waren. Auch dieser Umstand spricht gegen die Wirkung des Immunserums im Sinne einer Polyvalenz. Der Stamm »München« hält betreffs der Erscheinungen an der Infektionsstelle die Mitte zwischen beiden. Es hat doch den Anschein, dafs die Intensität der Reaktionserscheinungen am Infektionsorte, d. i. die Ausbildung der Infiltrate, mit der Stärke der Aggressivität dieser drei Stämme in Zusammenhang gebracht werden mufs. Wir müssen uns vorstellen, dafs die Wirkung eines Hühnercholera-Immunserums gegen die Vermehrungsfähigkeit der Bakterien, gegen ihre Aggressivität, gerichtet sein mufs. Ein stark wirkendes Immunserum wird die Vermehrungsfähigkeit der Bakterien stark hemmen, oder umgekehrt, wird jener Bakterienstamm die stärkste Aggressivität aufweisen, welcher sich trotz des Immunserums noch an der Infektionsstelle zu vermehren vermag. Der Einbruch und die Vermehrung im Blute wird ein sicher wirkendes Immunserum stets zu verhindern imstande sein. Wir sind nun aus dem Grunde geneigt, dem Stamm »Prag« der infolge seiner Vermehrung am Infektionsorte die Ausbildung der Infiltrate bedingt, die stärkste Aggressivität zuzuschreiben. Der fortwährende Aufenthalt dieses Stammes im Tier wird wohl als Grund hierfür angesehen werden müssen. Der Virulenz nach, d. h. was die Zahl der einzuführenden Keime betrifft, um ein Tier zu töten, bestehen in bezug auf diese drei Stämme keine Unterschiede.

Alle drei sind imstande, vielleicht in einem Bakterienexemplar ein Kaninchen zu töten, die Differenzen dieser drei Bakterienstämme beziehen sich nur auf ihre Aggressivität.

Um eine hohe Immunität zu erzeugen, ist es auch notwendig, mit einem möglichst aggressiven Stamm die zur Immunisierung verwendeten Exsudate zu gewinnen; denn von der Stärke der Aggressivität wird hauptsächlich der antiaggressive Zustand des Tieres abhängen. Exsudate, denen durch Erhitzen die Aggressivität genommen ist, wirken nur schwach oder gar nicht immunisatorisch, wie wir aus Versuchen von Bail bei Typhusbazillen wissen. Bei den hämorrhagischen Septikämieerregern die Virulenz für Kaninchen zu steigern, wird man kaum nötig haben, anders ist es aber mit der Aggressivität, wie man es besonders schön bei Schweineseuche beobachten kann. Man sieht im Laufe der Tierpassagen das Exsudat gewissermafsen aggressiv werden. Die anfangs dicke, zähe, zellreiche Flüssigkeit wird dünn, die Zellen schwinden, Bakterien finden sich in Unmengen vor, Phagocytose ist nie zu beobachten. Derartige Exsudate sind für die Immunisierung die geeignetsten.

Über den Mechanismus der Aggressinimmunität läfst sich vorderhand nichts Bestimmtes aussagen. In einer früheren Arbeit über die aktive Immunität bei Hühnercholera konnte durch die Aggressintheorie die Pasteursche Immunisierungsmethode damit erklärt werden, dafs durch geeignete Abschwächungsmethoden (Luftzutritt) den Hühnercholerabazillen ein Teil ihrer Aggressivität genommen wird, so dafs diese Bakterien, in den Tierkörper gelangt, nicht mehr so viel Aggressin bilden, als zur schrankenlosen Vermehrung ausreicht. Infolge dieses Defektes ihrer Aggressivität verhalten sich diese Bakterien wie Halbparasiten, die das Tier nicht mehr unter allen Umständen töten. Das durch die Vermehrung im Infiltrate gebildete Aggressin reicht jedoch aus, nach der Resorption das Tier immun zu machen. Haben wir nun ein Tier mit Immunserum behandelt und spritzen darnach virulente Bazillen ein, so entstehen ebenfalls durch die eingeführten Bakterien Infiltrate, welche vollständig denen durch die Pasteurschen Vaccins entstandenen entsprechen. Das dem

Tier einverleibte Immunserum übt im Tierkörper dieselbe Wirkung auf die Bakterien aus, die Pasteur extra corpus durch Abschwächungsmethoden erzielt hat, es nimmt den Bakterien ihre unbegrenzte Vermehrungsfähigkeit, ihre Aggressivität. Aus dem Grunde wollen wir dieses Immunserum als antiaggressives bezeichnen. Dafs das Immunserum nicht bakteriolytische Wirkung entfaltet, zeigt schon der Umstand, dafs sich die Bakterien im Infiltrate der immunen Tiere vermehren und ihre Virulenz ungeschwächt beibehalten.

Wir müssen auch in Erwägung ziehen, dafs der Schutzwert von $^1/_2$ ccm Immunserum schon ein sehr hoher ist. Wir dürfen denselben selbstverständlich nicht mit einem bakteriziden oder antitoxischen Serum in Parallele setzen, wo Bruchteile von tausendstel Kubikzentimeter Schutz verleihen. Denn dabei ist der Schutz gegen die einfach tödliche Dosis gerichtet. In unserem Falle ist aber die einfach tödliche Dosis eine Bakterienzelle. Es sei hier auf eine Äufserung von Sobernheim im Handbuch von Wassermann und Kolle hingewiesen, der von einem hochwertigen Milzbrandimmunserum folgendes verlangt: »Wenn z. B. von sechs Kaninchen, die mit steigenden Mengen von 1—6 ccm Serum intravenös behandelt und kurz darauf mit $^1/_{1000}$ Öse virulenter Milzbrandkultur subkutan geimpft werden, die Hälfte oder gar mehr mit dem Leben davonkommen, auch die übrigen später als die Kontrolltiere sterben, so ist dies ein Resultat, wie es nur von einem hochwertigen Serum zu erwarten ist.« Wir sehen, dafs die Ansprüche, die man an ein Immunserum stellt, das gegen septikämische, intensiv vermehrungsfähige Keime gerichtet ist, recht bescheidene sind. Immerhin sind die Resultate, die man durch Immunisierung mit aggressivem Exsudat bekommt, ungleich bessere. So kann Bail durch eine einmalige Injektion von $^1/_2$ ccm antiaggressiven Immunserums jedes Kaninchen sicher gegen virulenten Milzbrand schützen. Ebenso verleiht, wie aus den vorhergehenden Versuchen ersichtlich, $^1/_2$ ccm Immunserum den Kaninchen sicheren Schutz gegen Hühnercholerabakterien, welche, was Aggressivität anlangt, den Milzbrand sicher überragen.

Es erübrigt noch, auf einen Punkt im Anschlufs an die Kaninchenversuche einzugehen. Wir wissen, dafs der übertragene Schutz nur kurze Zeit, zwei Wochen wird im allgemeinen angenommen, andauert, was wohl auch beim Hühnercholera-Immunserum der Fall sein wird. Nun bleiben aber die Bakterien noch sehr lange im Infiltrate lebensfähig und virulent. Man müfste also denken, dafs theoretisch aus dem Grunde eine passive Immunisierung unmöglich wäre, da zu einer Zeit, wo der passive Impfschutz schon geschwunden ist, die noch lebenden Bazillen das Tier töten. Die praktische Erfahrung spricht jedoch dagegen. Dieser Umstand wird sich wohl damit erklären lassen, dafs durch die Aufsaugung der Infiltrate, die beim passiv immunisierten Tiere entstehen, die Tiere nachher aktiv immun werden, wie durch Impfung mit Pasteurschen Vaccins.

Was die Immunisierungsversuche mit Vögeln anlangt, so sind dieselben nicht so günstig. Das Kaninchenimmunserum schützt zwar Tauben, — andere Vögel wurden bisher nicht untersucht —, doch sind die Resultate nicht so befriedigend wie die mit Kaninchen und Mäusen.

Das hierzu verwendete Immunserum stammte von Kaninchen VI. Die Infektion wurde mit Stamm »Prag« vorgenommen.

Taube I (Kontrolle). 2 ccm normales Kaninchenserum subkutan; nach 14 Stunden $^1/_{20}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach 21 Stunden. An der Infektionsstelle harte Schwellung von gelblichweifser Farbe, auf die Muskulatur übergreifend. Im Infiltrate mikroskopisch enorme Mengen von Bazillen, keine Zellen. Das Herzblut mikroskopisch wimmelnd von Bazillen.

Taube II. 2 ccm Immunserum subkutan. Nach 14 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 48 Stunden bohnengrofse, harte, begrenzte Infiltration. Nach drei Tagen Infiltrat unverändert. Nach 8 Tagen gestorben. Im Infiltrate zahlreiche, im Herzblut mikroskopisch spärliche Bazillen.

Taube III. 1 ccm Immunserum subkutan; nach 14 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 48 Stunden wie Taube III. Nach 3 Tagen ebenso. Stirbt nach 5 Tagen. Im Infiltrate an der Infektionsstelle zahlreiche Bazillen, im Herzblute mikroskopisch sehr spärliche Bazillen.

Taube IV. 0,25 ccm Immunserum subkutan; nach 14 Stunden $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 48 Stunden mehr diffuse, weiche, erbsen-

große Infiltration. Nach 3 Tagen Infiltration derb, hart. Nach 5 Tagen ebenso. Nach 14 Tagen Infiltrat verschwunden. Lebt.

Die individuelle Verschiedenheit dieser Taube dürfte der Grund für das Überleben sein.

In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, daß die aktive Immunisierung von Hühnern und Tauben mit Kaninchenexsudat relativ leicht gelingt und eine vollkommene ist. Wenn nun die passive Immunität mit Kaninchenimmunserum bei Tauben teilweise versagt, so dürfte die Ursache davon in dem eigentümlichen Verhältnis homologer und heterologer Sera begründet sein. Dabei darf nicht vergessen werden, daß die Heterologie in diesen Versuchen eine zweifache ist, indem einerseits das Kaninchenimmunserum eine Tauben fremdartige Flüssigkeit ist, anderseits die Kaninchen mit Kaninchenexsudat also ebenfalls einer Tauben fremden Flüssigkeit behandelt wurden. Das dürfte nicht ohne Einfluß sein. Das Aggressin muß ja, auch wenn es von verschiedenen Tieren stammt, im Prinzip dasselbe sein, geringe, vielleicht nur quantitative Differenzen lassen sich wohl je nach der verwendeten Tierart erwarten. Bei Mäusen, und wie wir auch sehen werden bei Meerschweinchen kommen diese Umstände weniger in Betracht, vielleicht aus dem Grunde, weil sie als Nager dem Kaninchen verwandte Tiere sind. Mit Sicherheit läßt sich aber über diese komplizierten Verhältnisse nichts aussagen. Doch läßt sich erwarten, daß ein höherwertiges Immunserum, von geeigneten Tieren gewonnen, auch bei Vögeln sichere Resultate erzielen wird.

Alle vorhergehenden Versuche wurden, wie schon des öfteren erwähnt und auch aus den Versuchsprotokollen ersichtlich ist, derart ausgeführt, daß das Immunserum mehrere Stunden vor den Bakterien gegeben wurde. Dieser Infektionsmodus wurde teils aus dem Grunde gewählt, weil für eine praktische Anwendung nur eine solche Immunisierungsart in Betracht kommen konnte, teils auch deshalb, weil wir es hier nicht mit einem bakteriziden oder antitoxischen Serum zu tun haben. Der Schutz, den ein bakterizides Immunserum verleiht, ist sofort gegeben, denn die

gleichzeitig eingespritzten Keime, die mit Immunkörpern beladen sind, finden im Tierkörper Komplement vor und werden aufgelöst, und sind, wenn die durch die Auflösung freiwerdende Giftmenge nicht zu grofs ist, um von den Leukozyten paralysiert zu werden, dem Organismus unschädlich. Vorzeitig einverleibt, wirkt das bakterizide Immunserum, wie die Erfahrung ergibt, ungleich schwächer. Ebenso wirkt das gleichzeitig mit dem Toxin eingespritzte antitoxische Immunserum sofort, weil es ja schon im Glase das Gift unwirksam macht. Andere Verhältnisse liegen jedoch beim antiaggressiven Immunserum vor, da die eingeführten Keime nicht abgetötet werden, sondern nur ihre intensive Vermehrung gehemmt wird. Wenn wir also ein antiaggressives Immunserum gleichzeitig mit den Bazillen einspritzen, so wird vielleicht schon die Zeit, welche verstreicht, bis das Immunserum resorbiert ist und in die Gewebssäfte übergeht, während welcher es noch keinen Schutz verleiht, genügen, dafs sich die Bakterien schon zu sehr vermehrt haben; denn die Vermehrung der Hühnercholerabakterien setzt beim Kaninchen im Gegensatz zum Milzbrand sofort ein. Das Immunserum wird also nach dieser Zeit aufserstande sein, gegen die zu grofse Bakterienmenge zu schützen. Denn jede Immunität, und besonders die passive, ist begrenzt und kann gebrochen werden. Immerhin mufste bei einem hochwertigen Immunserum dieser Umstand in Wegfall kommen. Aus dem Grunde wurde Kaninchen IV höher immunisiert, und mit dem Blutserum dieses Tieres wurden die nachfolgenden Versuche an Kaninchen und Mäusen ausgeführt.

Das hier verwendete Immunserum stammte von Kaninchen IV[1]), welches inzwischen durch zwei neuerliche Injektionen um 70 ccm Exsudat mehr bekommen hatte.

---

1) Siehe S. 151. Es sei hier darauf hingewiesen, dafs man mit dem Karbolzusatz behufs Sterilisierung der Exsudate — dieselbe wurde in der früheren Publikation über Hühnercholera genau beschrieben — bei Anwendung so grofser Exsudatmengen wie 30 oder 40 ccm heruntergehen mufs, damit die Tiere nicht einer Karbolvergiftung erliegen. Dieser Umstand ist oft recht schwierig, hängt zum grofsen Teile von der Zahl der Keime im Exsudate ab und lassen sich da leider genaue Vorschriften nicht geben.

Infektion mit Stamm „Prag".

Maus I (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan; gleich darauf $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach weniger als 14 Stunden. An der Infektionsstelle und im Herzblut mikroskopisch massenhaft Bazillen.

Maus II. 0,75 ccm Immunserum subkutan; gleich darauf $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus III. 0,25 ccm Immunserum subkutan; gleich darauf $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Infektion mit Stamm „Teplitz".

Maus I (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan; gleich darauf $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach 20 Stunden. An der Infektionsstelle und im Herzblut mikroskopisch massenhaft Bazillen.

Maus II. 0,75 ccm Immunserum subkutan; gleich darauf $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus III. 0,25 ccm Immunserum subkutan; gleich darauf $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Infektion mit Stamm „München".

Maus I (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan; gleich darnach $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach weniger als 14 Stunden. An der Infektionsstelle und im Herzblut mikroskopisch massenhaft Bazillen.

Maus II. 0,75 ccm Immunserum subkutan; gleich darnach $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Maus III. 0,25 ccm Immunserum subkutan; gleich darauf $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Lebt.

Immunserum von Kaninchen IV.

Infektion mit Stamm „Prag".

Kaninchen I (Kontrolle). 1400 g 1 ccm normales Kaninchenserum, auf der einen Seite subkutan; gleich darnach auf der anderen Seite subkutan $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur. Stirbt nach weniger als 14 Stunden. An der Infektionsstelle geringes Ödem, darin mikroskopisch massenhaft Bazillen, keine Zellen. Im Herzblut mikroskopisch wimmelnd von Bazillen. In der Pleurahöhle klare Flüssigkeit.

Kaninchen II. 750 g 1 ccm Immunserum subkutan; gleich darnach auf der anderen Seite $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 48 Stunden an der Infektionsstelle haselnufsgrofses derbes Infiltrat. Nach 8 Tagen Infiltrat nekrotisch. Nach 2 Wochen Infiltrat verschwunden. Lebt.

Infektion mit Stamm „Teplitz".

Kaninchen I (Kontrolle). 2000 g 1 ccm normales Kaninchenserum, darin aufgeschwemmt $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach weniger als 18 Stunden. An der Infektionsstelle diffuses, blutiges, geringes Ödem

Darin mikroskopisch massenhaft Bazillen, keine Zellen. Im Herzblute mikroskopisch massenhaft Bazillen. In der Pleura- und Peritonealhöhle klare Flüssigkeit.

Kaninchen II. 850 g 1 ccm Immunserum, darin aufgeschwemmt $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 24 Stunden erbsengrofses, begrenztes Infiltrat. Nach 5 Tagen Infiltrat derb. Nach 1 Woche Infiltrat verschwunden. Lebt.

Infektion mit Stamm „München".

Kaninchen I (Kontrolle). 1600 g 1 ccm normales Kaninchenserum subkutan; gleich darnach auf der anderen Seite $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Stirbt nach weniger als 14 Stunden. An der Infektionsstelle geringes blutiges Ödem; darin mikroskopisch massenhaft Bazillen, keine Zellen. Im Herzblute mikroskopisch massenhaft Bazillen. In der Pleurahöhle klare Flüssigkeit.

Kaninchen II. 820 g 1 ccm Immunserum subkutan; gleichzeitig auf der anderen Seite $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur subkutan. Nach 48 Stunden erbsengrofses, derbes Infiltrat, scharf begrenzt. Nach 8 Tagen Infiltrat nekrotisch. Nach 14 Tagen Infiltrat vollständig verschwunden. Lebt.

Wir entnehmen daraus, dafs ein hochwertiges Immunserum auch bei gleichzeitiger Einverleibung Mäusen und Kaninchen und, wie wir später sehen werden, Meerschweinchen sicheren Schutz verleiht. Auch geht aus diesen Versuchen hervor, dafs trotz gleichzeitiger Einverleibung die Reaktionserscheinungen an der Infektionsstelle bei Kaninchen viel geringere sind, als in den früheren Versuchen, wo das Immunserum noch nicht so hochwertig war, und es läfst sich erwarten, dafs, wenn die Immunität noch höher getrieben wird, die Infektion bei passiver Immunität ganz reaktionslos verlaufen wird.

Die vollkommen sicheren Resultate, welche die vorangehenden Versuche mit gleichzeitiger Einverleibung des Immunserums und der Bazillen ergaben, liefsen auch Erfolge erwarten, wenn man ein schon infiziertes Tier mit Immunserum behandelt. Kaninchen I (Kontrolle), 820 g, erhält $^1/_{20}$ Tropfen Bouillonkultur Stamm »Prag« und stirbt nach acht Stunden typisch. Kaninchen II, 760 g, erhält $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur und nach zwei Stunden $2^1/_2$ ccm Immunserum von Kaninchen IV. An der Infektionsstelle bildet sich ein handtellergrofses Infiltrat aus, das sich verhärtet, dadurch eine Kontraktur des einen Hinterbeines bedingt. Stirbt nach neun Tagen.

Der rasche Tod des Kontrolltieres ist darauf zurückzuführen, dafs zu diesem Versuche ein der Gröfse des Immuntieres entsprechendes gewählt wurde. Die Kontrolltiere in den früheren Versuchen, wo der Tod nach 12—20 Stunden erfolgte, waren stets gröfsere Tiere; als Immuntiere wurden auch dort, wie schon erwähnt, nur kleine Tiere gewählt. Beim Immuntier dieses Versuches, welches zwei Stunden nach der Infektion, wo sich die Bakterien schon sehr stark vermehrt hatten, mit Serum behandelt wurde und nach neun Tagen starb, erfolgte der Tod nicht durch die Infektion, denn das Blut enthielt keine Bakterien. Den Tod hatte die Ausbildung des starken Infiltrates an der Infektionsstelle durch Marasmus bedingt. Letzteres hatte die hier angewendete Immunserummenge nicht zu verhindern vermocht; eine gröfsere Dosis wäre auch hier wirkungsvoll gewesen. Dies konnte aus dem Grunde nicht durchgeführt werden, weil zu diesem Versuche der letzte Rest des Immunserums von Kaninchen IV aufgebraucht wurde. Jedenfalls spricht schon dieser Versuch für die ungemein starke und sichere Wirkung des Immunserums.

Hatten schon die Kaninchenimmunversuche ein vollständiges Fehlen von bakteriziden Eigenschaften des Immunserums ergeben, so war es doch noch von Interesse; die Vorgänge in der Bauchhöhle von passiv immunisierten Meerschweinchen zu verfolgen, um auch dabei zu beobachten, welche Rolle die Leukozyten spielen. Betreffs derselben konnten auch im immunen Kaninchen nie phagozytierende Eigenschaften beobachtet werden; im Infiltrate der immunen Tiere finden sich zwar massenhaft Leukozyten, aber keine Phagozytose, und selbst wenn das Infiltrat nekrotisch wird, finden sich neben Leukozytentrümmern noch immer freie Bazillen. Voges, der intraperitoneale Meerschweinchenversuche mit Schweineseuchebakterien anstellte, fand bei resistenten Tieren, welche die Infektion überstanden, nie Bakteriolyse, auch eine Tätigkeit der Leukozyten als Phagozyten konnte er nicht konstatieren. Die eingespritzten Keime wurden immer spärlicher, und die Bauchhöhle war gewöhnlich nach 48—72 Stunden steril. Bei diesen Versuchen hatte Voges auch die Beobachtung gemacht, dafs auf gleiche Weise das normale Serum von verschie-

denen Tieren, wie das Blutserum von Tieren, die mit den Schweineseuchebakterien vorbehandelt waren, den Meerschweinchen gegen eine intraperitoneale Infektion Schutz verleiht, wenn er das Serum 24 Stunden vor der Infektion einspritzt. Auf gleiche Weise aber blieb sowohl normales Serum als auch Serum von behandelten Tieren, bei gleichzeitiger Einführung oder wenige Stunden vor der Infektion eingeführt, wirkungslos. Wir konnten schon mehrfach darauf hinweisen, dafs wir bei Mäusen, Kaninchen und Tauben bei subkutaner Infektion mit Hühnercholerabakterien nie eine Spur jener Resistenz beobachten konnten; denn die Kontrolltiere, die stets die dem Immunserum entsprechende Menge normalen Serums bekommen, zeigten nie eine dadurch bewirkte Lebensverlängerung oder atypischen Befund. Voges verlangt von der spez. Wirkung eines Immunserums, dafs es, gleichzeitig mit den Bakterien eingespritzt, Schutz verleiht. Es werden auch beim Meerschweinchen in bezug auf die gleichzeitige und vorzeitige Immunserumgabe dieselben Umstände in Betracht zu ziehen sein wie beim Kaninchen. Immerhin wurden die nachfolgenden Versuche mit Meerschweinchen, da wir über ein ziemlich hochwertiges Immunserum verfügten, derart angestellt, dafs Immunserum und Bazillen gleichzeitig intraperitoneal eingespritzt wurden.

Das Immunserum zu diesen Versuchen stammte von Kaninchen IV, welches auch zu den letzten Versuchen verwendet wurde.

Infektion mit Stamm „Prag".

Meerschweinchen I (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum intraperitoneal; gleich darnach $^1/_{10}$ ccm Bouillonkultur intraperitoneal.

Nach 1 Stunde: Vereinzelte Bazillen, vereinzelte Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 2 Stunden: Deutliche Vermehrung der Bazillen, zahlreiche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 6 Stunden: Massenhaft Bazillen, spärliche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 7 Stunden: Enorme Mengen von Bazillen, wenige Leukozyten, keine Phagozytose (schwer krank).

Stirbt nach 9 Stunden. In der Bauchhöhle 2 ccm dicken trüben Exsudates, darin mikroskopisch enorme Mengen von Bazillen, wenige Zellen, keine Phagozytose, keine Auflagerungen. Im Herzblute mikroskopisch Bazillen.

Meerschweinchen II. 1 ccm Immunserum intraperitoneal; gleich darauf $^1/_{10}$ ccm Bouillonkultur intraperitoneal.

Nach 1 Stunde: Vereinzelte Bazillen, spärliche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 2 Stunden: Vereinzelte Bazillen, zahlreiche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 6 Stunden: Spärliche Bazillen, zahlreiche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 7 Stunden: Spärliche Bazillen, sehr zahlreiche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 9 Stunden: Beginnende Vermehrung der Bazillen, massenhaft Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 24 Stunden: Massenhaft Bazillen, reiner Eiter (grofse polynukleäre Leukozyten und Makrophagen), keine Phagozytose. Tier vollkommen munter.

Nach 48 Stunden: Noch ungemein zahlreiche Bazillen, dicker Eiter, Phagozytose nicht sicher. Tier vollkommen munter.

Nach 72 Stunden: Weniger Bazillen, zum Teil schlecht gefärbt, zum Teil in feine Fädchen oder in Körnchen zerfallen, zahlreiche Leukozyten, Phagozytose nicht sicher.

Nach 96 Stunden: Vereinzelte Bazillen, zahlreiche Leukozyten, keine Phagozytose. Lebt.

Infektion mit Stamm „Teplitz“.

Meerschweinchen I (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum intraperitoneal; gleich darnach $^1/_{10}$ ccm Bouillonkultur intraperitoneal.

Nach 1 Stunde: Vereinzelte Bazillen, spärliche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 2 Stunden: Vereinzelte Bazillen, zahlreiche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 5 Stunden: Sehr zahlreiche Bazillen, wenige Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 6 Stunden: Massenhaft Bazillen, spärliche Leukozyten, keine Phagozytose (schwer krank).

Nach 7 Stunden: Enorme Mengen von Bazillen, einzelne Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 9 Stunden sterbend. Stirbt in der Nacht. In der Bauchhöhle dicktrübes Exsudat, darin mikroskopisch massenhaft Bazillen, wenige Zellen, keine Phagozytose. Peritoneum des Darmes intensiv gerötet (akute Peritonitis). Im Herzblut mikroskopisch zahlreiche Bazillen. In der Brusthöhle klare Flüssigkeit.

Meerschweinchen II, 255 g. 1 ccm Immunserum intraperitoneal; gleich darauf $^1/_2$ ccm Bouillonkultur intraperitoneal.

Nach 1 Stunde: Vereinzelte Bazillen, spärliche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 2 Stunden: Vereinzelte Bazillen, zahlreiche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 5 Stunden: Einzelne Bazillen, sehr zahlreiche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 6 Stunden: Einzelne Bazillen, massenhaft Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 7 Stunden: Hie und da ein Bazillus, reiner Eiter, keine Phagozytose.

Nach 24 Stunden: Massenhaft Bazillen, reiner, dicker Eiter, keine Phagozytose, Tier vollkommen munter.

Nach 48 Stunden: Kapillarentnahme wahrscheinlich wegen des dicken Eiters unmöglich. Lebt.

Infektion mit Stamm „München".

Meerschweinchen I (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum intraperitoneal; gleich darnach $^1/_{10}$ Tropfen Bouillonkultur intraperitoneal.

Nach 1 Stunde: Vereinzelte Bazillen, spärliche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 2 Stunden: Spärliche Bazillen, zahlreiche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 5 Stunden: Sehr zahlreiche Bazillen, spärliche Leukozyten, keine Phagozytose (schwer krank).

Nach 6 Stunden: Massenhaft Bazillen, wenige Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 7 Stunden: Massenhaft Bazillen, spärliche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 9 Stunden sterbend. Stirbt in der Nacht. In der Bauchhöhle leicht blutiges, dicktrübes Exsudat, darin mikroskopisch enorme Mengen von Bazillen, wenige Zellen, keine Phagozytose. Ungemein starke Rötung des Darmperitoneums und Blutung ins Netz (akute Peritonitis). Im Herzblut mikroskopisch zahlreiche Bazillen.

Meerschweinchen II. 290 g. 1 ccm Immunserum intraperitoneal; gleich darauf $^1/_{10}$ ccm Bouillonkultur intraperitoneal.

Nach 1 Stunde: Vereinzelte Bazillen, spärliche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 2 Stunden: Vereinzelte Bazillen, zahlreiche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 5 Stunden: Einzelne Bazillen, sehr zahlreiche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 6 Stunden: Hie und da ein Bazillus, massenhaft Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 7 Stunden: Einzelne Bazillen, reiner Eiter, keine Phagozytose.

Nach 24 Stunden: Spärliche Bazillen, dicker Eiter, keine Phagozytose.

Nach 48 Stunden: Spärliche Bazillen, dicker Eiter, keine Phagozytose. Lebt.

In dem folgenden Versuche wurde das Immuntier mit einer gröfseren Menge Bazillen infiziert; Immunserum von Kaninchen IV. Infektion mit Stamm »München«.

Meerschweinchen I (Kontrolle). 1 ccm normales Kaninchenserum intraperitoneal; gleich darauf $^1/_{10}$ ccm Bouillonkultur intraperitoneal.

Nach 1 Stunde: Spärliche Bazillen, zahlreiche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 3 Stunden: Ziemlich zahlreiche Bazillen, zahlreiche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 6 Stunden: Massenhaft Bazillen. Spärliche Leukozyten, keine Phagozytose. (Tier schwer krank.)

Nach 8 Stunden: Massenhaft Bazillen. Vereinzelte Leukozyten, keine Phagozytose.

Stirbt nach $9^1/_2$ Stunden. In der Bauchhöhle dicktrübes Exsndat, darin spärliche Zellen, keine Phagozytose, massenhaft Bazillen. Im Herzblut mikroskopisch Bazillen.

Meerschweinchen II. 1 ccm Immunserum intraperitoneal; gleich darauf $^1/_2$ ccm Bouillonkultur intraperitoneal.

Nach 1 Stunde: Ziemlich zahlreiche Bazillen, spärliche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 3 Stunden: Ziemlich zahlreiche Bazillen, sehr zahlreiche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 6 Stunden: Spärliche Bazillen, sehr zahlreiche Lenkozyten, keine Phagozytose.

Nach 8 Stunden: Spärliche Bazillen, sehr zahlreiche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 10 Stunden: Spärliche Bazillen, Eiter, keine Phagozytose.

Nach 24 Stunden: Vereinzelte Bazillen, dicker Eiter, keine Phagozytose. Lebt.

Die Vorgänge in der Bauchhöhle spielen sich folgendermafsen ab. In den ersten zwei Stunden treten zwischen Kontroll- und Immuntier keine Differenzen auf. Das der Bauchhöhle entnommene Exsudat weist in jedem Gesichtsfeld vereinzelte Keime — die eingespritzten Bazillen — auf und ziemlich zahlreiche Leukozyten. Letztere sind durch den Reiz, welchen die injizierte Flüssigkeit gesetzt hat, herbeigelockt, da nach dieser Zeit eine wesentliche Vermehrung der Bazillen und eine Beeinflussung der Leukozyten (beim Kontrolltier) durch dieselben noch nicht stattgefunden hat. Anders gestaltet sich das Bild nach 5 Stunden. Beim Kontrolltiere merkt man nach dieser Zeit schon eine starke Vermehrung der Bazillen, während die Leukozytenzahl abnimmt, beim Immuntiere hingegen ist die Zahl der Bazillen nicht vermehrt, wohingegen massenhaft Leukozyten auftreten. Phagozytose konnte weder beim Kontrolltier noch

beim Immuntier mit Sicherheit beobachtet werden. In den folgenden Stunden spielen sich beim Immuntier und Kontrolltier die entgegengesetzten Vorgänge ab. Während bei ersterem die Zahl der Bazillen sich nicht vermehrt und die Leukozytenzahl ungemein reichlich bis zur dicken Eiterbildung zunimmt, verringern sich bei letzterem die Leukozyten, die Zahl der Bazillen hingegen wächst rapide bis zum Tode des Tieres, welcher stets unter starker Abnahme der Temperatur erfolgt.

Auffallend und überraschend ist der Befund bei den Immuntieren nach 24 Stunden. Man findet nach dieser Zeit eine starke, fast erschreckende Vermehrung der Bazillen, so dafs man nach dem Bauchhöhlenbefund um das Leben des Tieres fürchtet. In unserem Versuche tritt dies besonders beim Stamm »Prag« und »Teplitz« hervor. Die Vermehrung der Bazillen im Immuntiere ist eine so intensive wie beim Kontrolltiere etwa zwei Stunden vor dem Tode, dabei befinden sich die Tiere vollkommen munter und zeigen nicht die geringsten Krankheitserscheinungen. Neben den massenhaften Bazillen finden sich aber grofse Mengen von Leukozyten, — dicker Eiter, — welche wohl zum gröfsten Teile die Unschädlichkeit der Bakterien bewirken. Auffallenderweise konnte Phagozytose nie mit Sicherheit beobachtet werden. Wir haben also bei der intraperitonealen Infektion passiv immuner Meerschweinchen in der Bauchhöhle dieselben Vorgänge wie in der Subkutis subkutan infizierter passiv immuner Kaninchen, wo sich ebenfalls die Bakterien im Infiltrate vermehren und durch Anlockung der Leukozyten die Infiltrate bilden. Allerdings können wir uns vorstellen, dafs die in der Subkutis angesammelten Leukozyten eher einen für die Bakterien schwer zu durchdringenden Wall abgeben, so dafs eine Durchwachsung des Körpers unterbleibt, als in der freien Bauchhöhle. Es scheint aber auch hier den Leukozyten, wenn auch nicht als Frefszellen, eine grofse Bedeutung zuzukommen. Es konnten nämlich B a i l bei Cholera und K i k u c h i bei Dysentrie den Nachweis erbringen, dafs das Aggressin unter Leukozyteneinflufs geschädigt wird. Ähnliche Verhältnisse könnten auch hier vorliegen, indem die in grofser Menge angesammelten Leukozyten

die Bakterien ihrer Aggressivität beraubten, demnach die intensive Durchwucherung des Körpers ausbleibt, und selbst eine Vermehrung in oer Bauchhöhle von so gefährlichen Parasiten, denen ihre Aggressivität genommen, unschädlich ist. Wie weit Entgiftungsverhältnisse dabei in Betracht kommen, soll, da wir von dem Toxin und Endotoxin gerade der echten Parasiten so wenig Sicheres wissen, unentschieden bleiben. Die hinterherige Vermehrung tritt jedoch, wie schon Stamm »München« zeigt, nicht konstant auf, der Grund hierfür wurde nicht ermittelt. Eine analoge Beobachtung bei Milzbrand machte Sobernheim, welcher das Blut von immunen Tieren voll von Milzbrandbazillen fand. Dafs auch dieser Befund nicht konstant ist, zeigen Versuche von Bail, der zwar ebenfalls noch nach Tagen bei milzbrandimmunen Tieren die Bazillen lebend im Blut und in den Organen nachweisen konnte, aber nur in geringer Zahl.

Die nun folgenden Versuche zeigen, dafs die hinterherige Vermehrung der Bakterien in der Bauchhöhle auch bei aktiver Immunität und auch bei einem anderen Vertreter aus der Gruppe der Hüppeschen hämorrhagischen Septikämie, dem Schweineseuchebakterium, auftritt. Zur Immunisierung dieser Meerschweinchen wurde ebenfalls das sterilisierte, von den Bakterien befreite Brusthöhlenexsudat intrapleural mit Schweineseuchebakterien infizierter Kaninchen verwendet. Zur Infektion wurde ein frisch aus der Lunge eines Schweines gezüchteter Stamm verwendet.

Meerschweinchen I. 240 g.

$^1/_2$ ccm sterilisiertes Schweineseucheexsudat subkutan.

Nach 6 Tagen 1 ccm sterilisiertes Schweineseucheexsudat subkutan.

Nach 5 Tagen: $1^1/_2$ ccm sterilisiertes Schweineseucheexsudat subkutan.

Nach 14 Tagen mit $^1/_2$ ccm Bouillonkultur von Schweineseuche intraperitoneal infiziert.

Nach 1 Stunde: Spärliche Bazillen, wenige Leukozyten.

Nach 2 Stunden: Spärliche Bazillen, wenige Leukozyten.

Nach 5 Stunden: Deutliche, jedoch nicht starke Vermehrung der Bazillen, sehr zahlreiche Leukozyten.

Nach 24 Stunden: Sehr starke Vermehrung der Bazillen, sehr zahlreiche Leukozyten, Phagozytose nicht sicher. (Tier munter.)

Nach 48 Stunden: Weniger Bazillen, zahlreiche Leukozyten. Lebt und wurde weiter immunisiert.

Meerschweinchen II. 260 g. (Kontrolle.)

$^1/_2$ ccm Bouillonkultur von Schweineseuche intraperitoneal.

Nach 1 Stunde: Spärliche Bazillen, wenige Leukozyten.

Nach 2 Stunden: Wenige Bazillen, wenige Leukozyten.

Nach 5 Stunden: Ungemein starke Vermehrung der Bazillen, wenige Leukozyten.

Stirbt nach 20 Stunden. In der Bauchhöhle 1 ccm Exsudat, darin mikroskopisch enorme Mengen von Bazillen, keine Zellen. Keine Auflagerungen. In der Brusthöhle 1 ccm bazillenreiches Exsudat. Im Herzblut mikroskopisch massenhaft Bazillen.

Meerschweinchen III. 250 g.

$^1/_2$ ccm sterilisiertes Schweineseucheexsudat subkutan.

Nach 6 Tagen: 1 ccm sterilisiertes Schweineseucheexsudat subkutan.

Nach 5 Tagen $1^1/_2$ ccm sterilisiertes Schweineseucheexsudat subkutan.

Nach 15 Tagen: $^1/_{10}$ ccm Exsudat des Kontrolltieres des vorigen Versuches intraperitoneal.

Nach 1 Stunde: Spärliche Bazillen, vereinzelte Zellen.

Nach 2 Stunden: Spärliche Bazillen, vereinzelte Zellen.

Nach 5 Stunden: Spärliche Bazillen, zahlreiche Leukozyten, Phagozytose nicht sicher.

Nach 24 Stunden: Zahlreiche Bazillen, zahlreiche Leukozyten (Tier munter).

Nach 48 Stunden: Abnahme der Bazillen, jedoch immer noch sehr zahlreich, zahlreiche Leukozyten. Wurde weiterimmunisiert.

Meerschweinchen IV. (Kontrolle.) 280 g.

Intraperitoneal infiziert mit $^1/_{10}$ ccm Exsudat wie Meerschweinchen III.

Nach 1 Stunde: Spärliche Bazillen, vereinzelte Zellen.

Nach 2 Stunden: Spärliche Bazillen, vereinzelte Zellen.

Nach 5 Stunden: Starke Vermehrung der Bazillen, wenige Leukozyten.

Stirbt nach weniger als 18 Stunden. Subkutanes Ödem, darin mikroskopisch θ. In der Bauchhöhle trübes Exsudat, mikroskopisch wimmelnd von Bazillen, sehr spärliche Zellen. Keine Auflagerungen auf Leber und Netz. Darmperitoneum intensiv gerötet. In der Brusthöhle trübes Exsudat, darin mikroskopisch zahlreiche Bazillen. Im Herzblut mikroskopisch massenhaft Bazillen.

Jedenfalls zeigen diese Versuche infolge der Erscheinung der nachträglichen Vermehrung in der Bauchhöhle, dafs weder die Wirkung des Hühnercholera-Immunserums, noch das Wesen der aktiven Aggressinimmunität gegen Schweineseuchebakterien auf bakteriolytische Eigenschaften zurückzuführen ist. Bakterizide Reagenzglasversuche anzustellen, erschien angesichts der Tierversuche überflüssig. Was die agglutinierende Wirkung des

Immunserums betrifft, so zeigt dieselbe, wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich ist, einen fast negativen Befund. Wir wissen ja, dafs die Bedeutung der Agglutination für die Immunität eine sehr problematische ist.

Immunserum von Kaninchen IV.

Serum-verdünnung	Nach 1 Stunde bei 50°	Nach 24 Stunden bei Zimmertemperatur
1 : 10	negativ	etwas Bodensatz, überstehende Flüssigkeit trüb
1 : 50	negativ	negativ
1 : 100	negativ	negativ
1 : 1000	negativ	negativ

Meerschweinchen 300 g. Intraperitoneal infiziert mit $^1/_2$ ccm Bauchhöhlenexsudates eines passiv immunisierten und infizierten Meerschweinchens[1]).

Nach 1 Stunde: Zahlreiche Zellen, keine Bazillen.

Nach 2 Stunden: Zahlreiche Zellen, keine Bazillen.

Nach 8 Stunden: Massenhaft Leukozyten, keine Bazillen.

Nach 24 Stunden: Zahlreiche Bazillen, spärliche Leukozyten, keine Phagozytose. (Tier krank.)

Nach 25 Stunden: Massenhaft Bazillen, spärliche Leukozyten, keine Phagozytose.

Nach 27 Stunden: Enorme Mengen von Bazillen, wenige Leukozyten, keine Phagozytose.

Stirbt nach 30 Stunden. In der Bauchhöhle trübes Exsudat, darin mikroskopisch enorme Mengen von Bazillen, wenige Zellen, keine Phagozytose. Nirgends Auflagerungen. In der Brusthöhle klare Flüssigkeit. Im Herzblut mikroskopisch Bazillen.

Der vorangehende Versuch wurde ausgeführt, um zu erweisen, dafs die Bakterien im passiv immunen Meerschweinchen ihre Virulenz nicht verlieren. Das Bauchhöhlenexsudat wurde einem Meerschweinchen 24 Stunden nach der Infektion entnommen, welches nicht die nachträgliche Vermehrung der Bazillen in der Bauchhöhle gezeigt hatte und demgemäfs nur sehr wenige Keime, in dem Exsudate aber ungemein zahlreiche Leukozyten aufwies. Wie der vorhergehende Versuch zeigt, waren

1) Meerschweinchen II, S. 174.

durch 8 Stunden keine Bazillen in der Bauchhöhle aufgetreten. Der Grund hierfür kann entweder der sein, dafs die Zahl der eingespritzten Keime eine sehr geringe war oder der, dafs die massenhaft miteingespritzten lebenden Leukozyten, die aus einem immunen Tiere stammten, die Vermehrung der Bakterien für einige Stunden aufgehalten haben. Nach 24 Stunden ändert sich jedoch der Befund, indem sich die Bakterien in der Bauchhöhle vermehren und die Vermehrung derselben bis zum Tode des Tieres anhält. Die hinterherige Vermehrung, die immunen Tiere keinen Schaden bringt, bedeutet für ein normales Tier den Tod. Diesem Versuche entnimmt man also, dafs die Bakterien an sich im immunen Tier keine Veränderung erleiden, denn sie sind in geringster Menge befähigt, ein normales Tier zu töten. Nur der Zustand des aggressinimmunen Tieres mufs ein anderer geworden sein, um sich der lebenden Bakterien zu erwehren. Dieser Umstand, der für den Mechanismus der Aggressinimmunität von grofser Bedeutung zu sein scheint, und weiterer Untersuchungen bedarf, zeigt auch, dafs sich die Aggressinimmunität prinzipiell von der bakteriziden oder antitoxischen Immunität unterscheidet. Bei diesen beiden Arten der Immunität bedeutet eine Nichtzerstörung der Bakterien oder eine Nichtparalysierung des Giftes ein Verhängnis für das Tier.

Konnten wir durch eine frühere Untersuchung mit dem Exsudate infizierter Tiere, aus dem die lebenden Bakterien vollständig und zum gröfsten Teile auch die toten entfernt sind, bei Hühnercholera aktive Immunität erzielen, so zeigen diese Untersuchungen, dafs es gelang, durch Steigerung derselben im Blute dieser Tiere spezifisch wirkende Schutzstoffe aufzufinden. Drei von den hier verwendeten Kaninchen, von denen das Immunserum stammt, hatten, um ihre aktive Immunität zu prüfen, eine Infektion durchgemacht, hatten also einmal lebende Bazillen bekommen. Des theoretischen Interesses halber wurde Kaninchen VII nie infiziert, war also nur mit sterilisiertem Exsudat behandelt und nie mit lebenden Bazillen, und trotzdem wirkt sein Serum, wie ja zu erwarten war, in demselben Mafse schützend. Dasselbe gilt auch, wie noch nicht abgeschlossene

Untersuchungen gezeigt haben, für Schweineseuche. Die Mitwirkung lebender Bazillen erscheint also für diese Immunität nicht unbedingt nötig. Wir kommen noch auf diesen Punkt zurück. In diesem Jahre erschien von Wassermann und Citron eine Arbeit, in welcher sich die Verfasser mit der lokalen Immunität der Gewebe befassen. Dabei erörtern sie auch die Frage, dafs es bei vielen Mikroorganismen nicht gelingt, durch Behandlung mit toten Bakterien, welche zur Erzeugung der bakteriziden Immunität hinreichen, Immunität zu erzielen, und dies mifslingt, wie die Autoren meinen, gerade bei jenen Mikroorganismen, welche die Tiere spontan infizieren, welche für die betreffende Tierspezies homolog sind; hierzu ist unbedingt die Einführung lebender Mikroorganismen nötig, selbst auf die schonendste Weise abgetötete sind vollkommen wirkungslos.

Tatsächlich sind die Methoden, welche zur Erzeugung der bakteriziden Immunität führen, allen jenen Bakterien gegenüber machtlos, welche nicht befähigt sind, im Tierkörper bakterizide Stoffe zu bilden. Und gerade auf Grund der Erkenntnis von der unzureichenden Wirkung der bakteriziden Immunität ist die Aggressintheorie entstanden, welche die Schwierigkeiten, welche für die bakterizide Immunität unüberwindliche waren, überwunden hat. Voges war der erste, der bei der hämorrhagischen Septikämie die vollständige Nutzlosigkeit der Behandlung mit toten Bakterien einsehen mufste, obgleich gerade hier von Pasteur schon der richtige Weg gezeigt war. Sobernheim spricht sich bei Milzbrand dahin aus, dafs es bisher nicht gelungen ist, durch tote Milzbrandbazillen oder durch chemische Produkte derselben Immunität zu erzeugen, und Wassermann und Citron präzisieren diesen Standpunkt dahin, dafs sie meinen, dafs gerade jenen Mikroorganismen gegenüber, welche die Tiere spontan infizieren, die Methoden der bakteriziden Immunität machtlos sind. Unserer Ansicht sind das alle echte Parasiten, wie hämorrhagische Septikämie und Milzbrand. Wir stimmen mit Wassermann und Citron vollkommen darin überein, dafs, wenn man Immunität mit Bakterien erzeugen will, man sie lebend einführen mufs; denn diese vermehren sich im Tier-

körper, erzeugen Aggressin, welches die Immunität bewirkt. Das sind tote Bakterien nie imstande. Der Wert der Aggressintheorie liegt darin, dafs sie erkannt hat, dafs Krankheit und Tod sowohl, als auch Immunität, an gewisse Eigenschaften der Krankheitserreger, an die aggressiven, unbedingt gebunden sind, und dafs es genügt, diese in das zu immunisierende Tier hineinzubringen. Und der grofse Vorteil, den die Aggressintheorie den praktischen Immunisierungsmethoden gebracht hat, liegt darin, dafs sie das Aggressin von den lebenden Bakterien trennt, so dafs die Immunisierung mit einer sterilen, gröfstenteils, wie bei Hühnercholera, Schweineseuche und Milzbrand vollkommen ungiftigen Flüssigkeit vorgenommen wird. Die Gefahr, die die Einführung lebender Bakterien mit sich bringt, wie Impfverluste oder Infektion gesunder Tiere, ist dabei vollständig ausgeschlossen. Die dadurch erzeugte Immunität ist eine hohe und dauernde und trotzdem lassen die Gewebssäfte dieser Tiere, — es mufs hier auf alle nach der Richtung hin publizierten Arbeiten verwiesen werden, — meistenteils keine bakteriziden Eigenschaften erkennen. Und gerade diejenigen Mikroorganismen, welche die Tiere spontan infizieren, wie Hühnercholera und Milzbrand, denen gegenüber die Methoden der bakteriziden Immunität versagen, zeigen infolge ihrer starken Aggressivität die besten Resultate. Wir führen zwar nicht lebende Bakterien ein, sondern das Produkt, welches das Leben der Bakterien im Körper anfacht, das Aggressin, und den allgemeinen Gesetzen folgend bildet der Organismus einen Gegenkörper, welcher die Aggressivität der Bakterien, ihre unbegrenzte Vermehrungsfähigkeit zunichte macht, und darin besteht das Wesen dieser Immunität.

Für eine hohe und dauernde aktive Immunität reicht die Behandlung mit sterilem Exsudat vollkommen aus, auch erreicht das Blutserum dieser Tiere einen starken Schutz, wenn die Immunität nur mit sterilem Exsudat hochgetrieben ist. Da aber durch die Sterilisierung des Exsudates die Aggressivität doch abgeschwächt wird, und da, wie wir aus bereits erwähnten Versuchen wissen, eine Abschwächung der Aggressivität auch eine Abschwächung der Immunität bedeutet, so wird man, um ein

hochwertiges Serum zu erlangen, schliefslich den Tieren unveråndertes Exsudat einführen, selbstverständlich erst dann, wenn die aktive Immunität eine entsprechend hohe ist, was bei Milzbrand von Bail schon durchgeführt wurde. Bei Hühnercholera wurde des theoretischen Interesses halber davon abgesehen, und werden diese Umstände erst bei Schweineseuche, worüber in nächster Zeit berichtet werden wird, in Betracht gezogen.

Nach Abschlufs dieser Arbeit erschien von Wassermann und Citron eine Publikation in der Deutschen medizinischen Wochenschrift, in welcher sich die beiden Autoren gegen die Bedeutung resp. Deutung der von Bail entdeckten Aggressine wenden. Von der den Aggressinen supponierten Wirkung greifen die Autoren nur eine heraus, nämlich die Infektionsbeförderung derselben. Wenn es gelingt, meinen die Verfasser, im Vereine mit den Bakterien aufserhalb des lebenden Körpers Substanzen zu erzeugen, welche die Infektion begünstigen, so hätten die Aggressine ihre Bedeutung verloren. Derartige Substanzen erzeugen sie aufserhalb des Tierkörpers durch Behandlung von Flüssigkeiten mit Bakterien. Auf dieselbe Art und Weise konnten auch Pfeiffer und Friedberger im normalen Serum Stoffe auffinden, welche die Bakteriolyse in der Meerschweinchenbauchhöhle aufheben. Die völlige Bedeutungslosigkeit letzterer für die Aggressine konnte aber Bail in einer im Archiv für Hygiene erschienenen Arbeit nachweisen. Abgesehen davon, dafs nirgends behauptet wurde, dafs die Aggressine ausschliefslich im Tierkörper gebildet werden, dafs sich im Gegenteil Bail bemühte, sie auch aufserhalb des Tierkörpers aufzufinden, um Sicherheit zu erlangen, dafs es Sekretionsprodukte der Bakterien sind, geht aus den Versuchen von Wassermann und Citron nicht mit Bestimmtheit hervor, ob die Tiere der Infektion, der fortschreitenden Vermehrung der Bakterien erlegen sind. Es ist aber immerhin möglich, dafs verschiedene Substanzen eine oder die andere Wirkungsweise gemeinsam haben können. Denn andere Eigenschaften der Aggressine als die Infektionsbegünstigung, wie Labilität, Leukozytenbeeinflussung, die sich, wie aus noch nicht veröffentlichten Versuchen mit Subtilis, sogar in der Eprouvette nachweisen lassen etc. haben die Verfasser nicht in den Rahmen ihrer Untersuchungen gezogen. Übrigens sind zurzeit ganz analoge Versuche im hiesigen Institute im Gange, wie die Untersuchungen über aggressive Eigenschaften junger Bouillonkulturen von Bail (siehe Salus, Wiener klin. Wochenschrift, 1905, Nr. 25), und nur der Beginn der Sommerferien setzte der Vollendung derselben ein Ziel. Was jedoch die Aggressinimmunität betrifft, von der Wassermann und Citron behaupten, dafs dieselbe auf einfachere und viel billigere Weise durch die von ihnen hergestellten, angeblich den Aggressinen analogen Präparaten erzielt werden kann, so mufs daran doch entschieden gezweifelt werden. Abgesehen davon, dafs die Aggressinimmunität

nicht auf bakteriziden Eigenschaften der Gewebssäfte beruht, worauf immer hingewiesen wurde, was aber der Fall sein müſste, wenn Bakterienleibessubstanzen die Ursache davon wären, so wurde mit Aggressinen gerade bei den Infektionserregern Immunität erzielt, wo die Methoden mit toten Bakterien oder Bakterienleibesbestandteilen unzureichend sind. So bei Milzbrand, Schweineseuche und Hühnercholera, wo gerade, wie in dieser Arbeit schon erwähnt, Wassermann und Citron angeben, daſs mit toten Bakteriendemnach wohl ebensowenig mit den von ihnen hergestellten »künstlichen Aggressinen« nichts auszurichten ist. Vollkommen sicher gelingt dies jedoch, wie auch diese Arbeit beweist, mit Aggressinen, die aus dem lebenden Organismus gewonnen sind.

Herr Professor Bail, der zurzeit abwesend ist, wird gelegentlich selbst auf die Fragen, die Wassermann und Citron berühren, zurückkommen.

Literatur.

Bail, Untersuchungen über natürliche und künstliche Milzbrandimmunität. Zentralblatt f. Bakt., Bd. 36, Nr. 2 u. 3.

Derselbe, Untersuchungen über Typhus- und Choleraimmunität. Archiv f. Hygiene, Bd. 52.

Kikuchi, Untersuchungen über das Dysenterieaggressin. Berliner klin. Wochenschr., 1905, Nr. 15.

Kitt, Immunität bei Geflügelcholera. Wassermann und Kolle, Handbuch d. pathogenen Mikroorganismen.

Sobernheim, Immunität bei Milzbrand. Wassermann und Kolle, Handbuch d. pathogenen Mikroorganismen.

Voges, Untersuchungen über die Erreger der hämorrhagischen Septikämie. Zeitschrift f. Hygiene u. Infektionskrankh., Bd. 23.

Wassermann und Citron, Die lokale Immunität der Gewebe und ihre praktische Wichtigkeit. Deutsche med. Wochenschr., 1905, Nr. 15.

Weil, Untersuchungen über Infektion und Immunität bei Hühnercholera. Archiv f. Hygiene, Bd. 52.

Derselbe, Die passive Aggressinimmunität bei Hühnercholera. Wiener klin. Wochenschr., 1905, Nr. 16.

Über Hämolyse im Reagensglas und im Tierkörper.

Von

Dr. **Oskar R. von Wunschheim,**

I. Assistenten am Institute.

(Aus dem Hygienischen Institute der k. k. Universität Innsbruck. Vorstand Prof. A. Lode.)

Einleitung.

Bis vor wenigen Jahren war man gewohnt, den Begriff der Bakterientoxine einfach so zu fassen, dafs wir unter Toxin ganz allgemein eine giftige Substanz verstanden, welche durch ihre deletäre Wirkung auf den tierischen Organismus ausgezeichnet war. Den eingehenden Arbeiten derjenigen Forscher, welche sich zur Aufgabe gemacht hatten, die Wirkungen der Bakterientoxine auf einzelne Elemente des tierischen Körpers, zunächst das Blut, zu studieren, haben wir die Erkenntnis zu danken, dafs in den Toxinen mancher Bakterien Giftanteile sich nachweisen lassen, welche eine spezielle Wirkung auf gewisse geformte Teile des Blutes ausüben, so sind die Bakteriohämolysine jene Toxinkomponenten, welche die Eigenschaft besitzen, Blutzellen in vitro zu vernichten.

Die Mehrzahl der heute vorliegenden Arbeiten befafst sich mit den sowohl von pathogenen als auch von nicht pathogenen Mikroorganismen produzierten Hämolysinen, welche Erythrozyten zu lösen pflegen. Aufser diesen kennen wir auch ein Gift, das imstande ist, Leukozyten zu vernichten, das »Leukozidin«.

normaler Tiere starke Tendenz zur Lösung gezeigt hatte. Es war ja von vornherein durchaus nicht auszuschliefsen, dafs nicht vielleicht beim lebenden infizierten Tiere während des Verlaufes des Krankheitsprozesses von seiten der beteiligten Mikroorganismen Hämolysin produziert und von den Erythrozyten gebunden würde, doch war ja damit keineswegs gesagt, dafs auch die Lösung der Blutzellen sofort erfolgen müsse. Wir wissen ja, dafs im Reagensglasversuch nach erfolgter Bindung des Lysins durch die roten Blutkörperchen erst eine gewisse Latenzzeit verstreicht, ehe die Blutkörperchen ihr Hämoglobin abzugeben pflegen.

Ähnliche Verhältnisse waren ja auch für das lebende Tier als möglich anzunehmen; durch Bakteriolysin geschädigte Erythrozyten konnten erst nach einiger Zeit in Lösung gehen und wir mufsten also bestrebt sein, eine Versuchsanordnung zu treffen, welche es uns ermöglicht, gleichzeitig entnommene Blutproben zu verschiedenen Zeiten auf den Austritt von Hämoglobin ins Serum zu untersuchen, um, im Sinne von Schur gesprochen, eine Nachlösung, die Nachhämolyse, konstatieren zu können.

Unter Erfüllung aller dieser Postulate glauben wir eine möglichst bequeme und auch leicht den Regeln aseptischen Arbeitens entsprechende Methodik eingeschlagen zu haben. Wir verwendeten zu den periodischen Blutentnahmen möglichst dünne, wenig Blut fassende Glaskapillaren in **U** form in einer Länge von ca. 8 cm bei einer Lichte von 1 mm. Es ist wichtig, darauf zu sehen, dafs stets Kapillaren von gleichem Querschnitt angefertigt werden. Indem wir eine Anzahl dieser Kapillaren sofort nach der Entnahme (vgl. weiter unten), andere erst nach beliebigen Zeiten zentrifugierten, erreichten wir unseren Zweck in einfacher Weise, indem wir in den sofort zentrifugierten Proben eine etwa bestehende Hämoglobinämie nachweisen, in den gelagerten Röhrchen eine etwa später erfolgte Lösung, die Nachhämolyse, konstatieren konnten.

Voruntersuchungen an normalen, nicht infizierten Tieren sollten uns zunächst eventuelle Fehlerquellen aufdecken.

Da kamen zwei Momente in Betracht.

Einmal die Frage nach der normalen Färbung der Blutsera der verschiedenen Tierspezies, ferner das Verhalten der normalen Blute mit Hinsicht auf den Begriff der spontanen aseptischen Hämolyse (v. Limbeck, Nolf, Schur).

Die normalen Sera verschiedener Tiere verhalten sich auch verschieden, was ihre Farbe anbelangt, eine bekannte Tatsache, welche aber bei Heranziehung der Serumfarbe zu Schlufsfolgerungen aus Farbenänderungen neues Interesse gewinnen mufste. Unter Verwendung unseres Kapillarentyps besitzen das Kaninchen, der Hund, die Katze ein fast farbloses Serum, das Meerschweinchen zeigt meist einen Stich ins Gelbe, doch kommen hier auch farblose Sera vor. Beim Huhne fanden wir als Regel farbloses Serum, nur ein einziges Tier zeigte aus nicht festzustellender Ursache eine ölgelbe Färbung und wurde nicht zum Versuche verwendet. Bei der Taube zeigten die normalen Sera ein schwankendes Verhalten. Wir sahen solche, die fast farblos waren, neben dunkelgelben und bräunlichgelben. Altersunterschiede schienen uns da eine Rolle zu spielen.

Wenn wir nun der spontanen aseptischen Hämolyse unsere Aufmerksamkeit ein wenig zuwenden, so erfahren wir, dafs schon v. Limbeck (9) angibt, dafs normalerweise Blutkörperchen in isotonischen Kochsalzlösungen nach längerer Zeit der Auflösung anheimfallen. Nolf (10) erwähnt die Autolyse der roten Blutkörperchen.

Schur (l. c) hat sich mit dem Studium dieser Tatsache experimentell eingehender befafst und nachgewiesen, dafs nach einer mehrtägigen Frist Blutkörperchen des Kaninchens in sterilen isotonischen Kochsalzlösungen sich lösen, dafs wir also mit der Existenz einer »aseptischen spontanen Hämolyse« zu rechnen haben. Wir mufsten also auch untersuchen, inwieweit diese eben erwähnten sozusagen physiologischen Eigenschaften der roten Blutzellen unsere Versuchsanordnung tangieren könnten, und dies war ja um so wichtiger, als die eben erwähnten Forscher die Blutkörperchen in isotonischen Kochsalzlösungen beobachteten, während bei unserer Untersuchungsmethode die Erythrozyten ja in ihrem eigenen Serum aufbewahrt werden mufsten. Schur

hat des ferneren gezeigt, dafs bei der Spontanhämolyse die Temperatur von grofsem Einflusse sei. Bei niedriger Temperatur konnte der genannte Autor nach fünf Tagen noch keine bedeutende Lösung konstatieren. Es gaben da 8 Tropfen Kaninchenblut in 0,85% Kochsalzlösung (Bestimmung mit dem Hämometer von Fleischl) nur Werte $<$ 10 Fleischlgrade, nach 8 Tagen erst 110 Fleischl. Wurden die Versuche bei einer Temperatur von 32° R angestellt, so ergaben sich, verglichen mit den bei Zimmertemperatur gehaltenen Proben, bedeutende Unterschiede hinsichtlich der Lösung zugunsten der höheren Temperatur. So erhielt Schur bei Zimmertemperatur nach 3 Tagen Werte $<$ 10, bei 32° R jedoch schon nach 24 Stunden eine Fleischlzahl $<$ 35, nach 2 Tagen von 70, nach 3 Tagen war schon vollständige Lösung eingetreten.

Für unsere Versuche war da zunächst zu ermitteln, innerhalb welcher Zeit normale Blutarten eventuell so viel Hämoglobin in das Serum austreten liefsen, dafs wir durch die aseptische spontane Hämolyse (als Nachhämolyse) in der Auffassung pathologischer Effekte zu Irrtümern hätten geführt werden können.

Wir liefsen also normale Blutproben in unseren Kapillaren lagern und verglichen von Zeit zu Zeit die Farbe des Serums der nun erst zentrifugierten Röhrchen mit der Serumfarbe derjenigen, welche sofort nach der Entnahme zentrifugiert worden waren. Man erhält da verschiedene Resultate, je nach der Tierspezies, aber auch individuelle Schwankungen kommen vor.

Vor allem mufs aber in technischer Hinsicht bei der Blutentnahme in äufserst vorsichtiger Weise vorgegangen werden, will man sich nicht von vornherein eines Versuchsfehlers schuldig machen. Nicht jeder Beobachter, der mit defibriniertem Blute zu arbeiten hat, ist sich vielleicht dessen genügend bewufst, und erst kürzlich hat Löwit (11) wiederum darauf aufmerksam gemacht, wie vorsichtig man beim Schütteln des geronnenen Blutes vorgehen mufs, will man das Serum möglichst frei von Blutfarbstoff erhalten. Je nachdem wir das Defibrinieren mit mehr oder weniger energischen Schüttelbewegungen vornehmen, können wir konstatieren, dafs das Serum einen mehr oder minder rötlichen

Farbenton annimmt, da durch Traumen offenbar Erythrozyten dermafsen lädiert werden, dafs sie ihren Blutfarbstoff austreten lassen. Starkes Quetschen u. dgl. kann auch bei unserer Technik der Blutentnahme einen gleich unerwünschten Einflufs ausüben.

Wir eröffneten, meist an Kaninchen experimentierend, durch einen senkrecht zur Längsachse des Kaninchenohres geführten, das Ohr durchtrennenden 1 cm langen Schnitt die am Rande verlaufenden Gefäfse. Für jede neue Blutentnahme wurde parallel der alten Entnahmestelle ein neuer Einschnitt gemacht. Beim Huhn entnahmen wir das Blut aus dem Kamme, bei der Taube aus der Flügelvene. Hund und Katze geben beim Einstich in das Ohr reichlich Blut; bei Meerschweinchen kann man durch Abtrennen kleiner Randpartien der Ohren genügende Blutmengen erhalten, doch eignen sich diese Tiere wegen ihrer Kleinheit und der geringen Angriffspunkte für die Blutentnahme nicht zu Versuchen, die sich über ein paar Tage erstrecken und zahlreiche Abnahmen erfordern.

Manchmal, allerdings seltener, konnten wir, trotzdem wir uns hinsichtlich unserer Behutsamkeit keinen Vorwurf zu machen hatten, einen stärkeren Stich ins Rötliche bei einer Serumprobe konstatieren, während andere gleichzeitig entnommene und mit derselben zentrifugierte Proben farblos waren; daran tragen vielleicht manche besonders empfindliche Erythrozyten die Schuld, wir konnten wenigstens eine andere Erklärung hierfür nicht finden. Aber diese Fälle sind doch so selten, zudem so leicht als »Versuchsfehler« zu erkennen, dafs sie nicht vermocht haben, einen Grund gegen die Verläfslichkeit unserer Methode zu bilden. Aufserdem schützt ja eine sogleich wiederholte Entnahme und der Vergleich mehrerer Röhrchen genügend vor Irrtum. Am besten verwendet man solche Tiere gar nicht, die bei der Blutkontrolle, welche unbedingt an jedem Tiere auszuführen ist, ehe man es in den Versuch einstellt, in dem Beobachter das Gefühl der Unsicherheit aufkommen lassen. Ebenso hat man Tiere, die bei der Serumkontrolle eine von der Norm abweichende Farbe des Serums zeigen, z. B. kanariengelb statt farblos beim Huhne oder Kaninchen unbedingt auszuschliefsen.

Aber nicht nur die Sera sind in ihrer normalen Farbe verschieden, auch die Erythrozyten verschiedener Tiere differieren in ihrem Verhalten bezüglich der normalen spontanen Hämolyse im eigenen Serum.

Ein gutes Beispiel ist das normale Hundeblut. Läfst man mit solchem Blute gefüllte Kapillaren bei Zimmertemperatur liegen, so kann man oft schon nach wenigen, immer aber nach Verlauf von 18—24 Stunden sehen, dafs das beim Zentrifugieren abgeschiedene Serum dunkelbraun, braunrot, ja weinrot gefärbt ist, Ausnahmen sind äufserst selten. Es ist also beim Hundeblut schon zu einer Zeit die spontane aseptische Hämolyse eingetreten, zu welcher die Sera anderer Tiere (Kaninchen, Katze, Huhn) noch ohne nennenswerte Färbung sind.

Dieses Verhalten des normalen Hundeblutes schliefst seine Verwertung, was die Nachhämolyse anbelangt, natürlich völlig aus.

Tabelle I zeigt das Verhalten normaler Sera, die zu verschiedenen Zeiten nach der Entnahme zentrifugiert wurden.

(Siehe Tabelle I auf Seite 193.)

Wir bezeichnen in unseren Tabellen unter Anwendung der Kapillarröhrchenmethode mit Hämolyse (H) die Lösung von Blutkörperchen, welche in den nicht länger als 30 Minuten nach der aus dem lebenden oder toten Tiere erfolgten Entnahme zentrifugierten Röhrchen konstatiert wurde. Als Nachhämolyse (NH) bezeichnen wir demgemäfs jede Hämolyse, welche bei erst später (über 30 Minuten) zentrifugierten Proben konstatiert wurde. Hier wäre zu bemerken, dafs — besondere Fälle natürlich ausgenommen — im allgemeinen die Blutproben zur Bestimmung der Hämolyse bis zu 30 Minuten bei Zimmertemperatur liegen gelassen wurden, um den Gerinnungsprozefs ablaufen zu lassen. Besonders bei den dem lebenden Tiere entnommenen Proben ist dies von Vorteil. Zentrifugiert man unmittelbar nach der Entnahme, so gerinnt das Fibrin ober den abgesetzten Blutkörperchen zu einer trüben glasigen Masse, welche die Beurteilung der Serumfarbe aufserordentlich erschwert. Die Zeit von 30 Minuten ist meist (Ausnahmen bei Streptokokkeninfektionen) nicht lange genug, um eine Nachhämolyse auch bei pathologischen Blut-

proben schon eintreten zu lassen, doch ist sie das Maximum an Verzögerung bei Feststellung des Farbentones der frischen Sera. Bei Sektionen wird man gut tun, Proben auch sofort zu zentrifugieren. Findet man bei am lebenden Tiere gemachten Entnahmen nach 30 Minuten Rotfärbung des Serums, so ist es ratsam, sofort eine neue Probe zu entnehmen und sogleich zu zentrifugieren.

Tabelle I.

Farbe des Serums normaler Tiere zu verschiedenen Zeiten (aseptische Spontanhämolyse).

Die Blutprobe wurde zentrifugiert, nach der Entnahme Stunden	Sofort Kontrolle	16 Stunden	24 Stunden
Kaninchen I	farblos	Stich ins Bräunliche	wie bei 16[1])
» II	farblos	—	fast farblos
» III	fast farblos	fast farblos	fast farblos
Meerschweinchen I	gelblich	—	wenig stärker gelblich als die Kontrolle
» II	gelblich	—	detto
» III	schwach gelblich	—	wie die Kontrolle
» IV	farblos	—	ziemlich stark bräunlich
Katze I, alt	farblos	farblos	farblos
» II, alt	farblos	—	fast farblos
Hund, 7 Wochen	farblos	—	weinrot
» 3 Monate	farblos	—	braunrot
» 1—2 Jahre	farblos	—	braunrot
» 4 Jahre	farblos	—	braunrot
Taube I	farblos	—	—
» II	dunkelgelb	—	etwas dunkler als die Kontrolle
» III	gelbbräunlich	—	wie die Kontrolle
» IV	gelbbräunlich	—	wie die Kontrolle
Huhn I	farblos	—	fast farblos[2])
» II, atypisch	ölgelb	—	wie die Kontrolle

Der Gerinnungsprozeſs wird durch Aufenthalt im Thermostaten (37 ° C) beschleunigt, doch möchten wir dieses Verfahren nicht empfehlen.

1) Nach 40 Stunden rötlichbraun, nach 64 Stunden rotbraun.

2) Nach 40 Stunden leichter Stich ins Bräunliche, nach 72 Stunden gelbbräunlich.

Dafs natürlich darauf zu sehen ist, dafs Verunreinigungen bei der Blutentnahme vermieden werden, bedarf kaum der Erwähnung. Wir haben aber, um die Gefahr möglicher Bakterienbeimengung richtig einschätzen zu können, zu wiederholten Malen normalen Kaninchen ohne Wahrung aseptischer Mafsnahmen mit nicht sterilisierten Kapillaren Blut entnommen, auch Hautschuppen und Haare dem Blute zugesetzt, ohne einen Unterschied im Vergleiche mit aseptischen Proben wahrnehmen zu können.

Nicht unerwähnt bleibe auch, dafs die verwendete Glassorte sorgfältig auf ihre Brauchbarkeit zu prüfen ist.

Unsere Beobachtungszeit der entnommenen Proben erstreckte sich meist auf mehrere Tage, doch haben wir bei Konstatierung unserer in den Tabellen verzeichneten Resultate — wenn nicht ausdrücklich anders angegeben ist — für die Nachhämolyse nur die Zeit von 24 Stunden in Betracht gezogen. Unsere Erfahrung lehrte, dafs innerhalb dieser Zeit nennenswerte Grade von aseptischer Spontanhämolyse nicht aufzutreten pflegen, anderseits aber dieser Zeitraum genügt, um das Eintreten oder Ausbleiben der Nachhämolyse festzustellen. Normales Kaninchenserum zeigte sich nach 24 Stunden meist ebenso farblos wie die Proben, welche sofort nach der Entnahme zentrifugiert wurden; allerdings finden wir, wie schon erwähnt, mitunter Tiere, deren Sera nach 24 Stunden einen leichten Stich ins Bräunliche zeigen, eine deutlich bemerkbare Farbenschwankung, die wir wohl auf ausgetretenen Blutfarbstoff zu beziehen haben werden. Es dürften ja normalerweise gewifs innerhalb von 24 Stunden Blutkörperchen spontan zugrunde gehen, doch ist diese durch Austritt des Hämoglobins bewirkte Färbung des Serums immerhin seltener und dann auch relativ noch so mäfsig, dafs sie für unsere Beurteilung nicht von Bedeutung sein kann, zumal ja alle Beobachtungen diesmal nur mit unbewaffnetem Auge gemacht werden mufsten und vorsichtigerweise nur auffallend starke Verfärbungen des Serums verwertet wurden. Bei einiger Erfahrung und Übung wird man nicht leicht Gefahr laufen, innerhalb der Grenzen normaler Schwankungen pathologische Prozesse zu sehen.

Als Grundsatz für unsere Untersuchungen wurde aufgestellt, erst solche Farbentöne für pathologisch zu nehmen, die stärker sind als der stärkste bei normalem Blute innerhalb von 24 Stunden jemals beobachtete Farbenton. Die Feststellung von Zahlen hätte für uns da eine grofse Erleichterung bedeutet, leider steht uns zurzeit kein Apparat, welcher uns in dieser Hinsicht hätte von Nutzen sein können, zur Verfügung. Für unsere, ja nicht in quantitativer, sondern nur rein prinzipieller Richtung angestellten Untersuchungen erwies sich ein bald erreichtes Mafs von Übung im Auseinanderhalten der Farbenintensitäten der Sera als durchaus genügend, um so mehr, als das Übersehen einer ausgesprochenen Hämoglobinämie (Hämolyse) völlig unmöglich ist.

Viel eher ist schon ein Fehler nach unten hin, natürlich in Hinsicht auf die Nachhämolyse möglich, insofern als wir vielleicht schon pathologische Farbentöne des Serums noch für normalerweise mögliche ansehen konnten. Aber es kommt nicht darauf an, gewissermafsen die Schwelle zwischen normaler und pathologischer Nachhämolyse zu bestimmen, es ist in prinzipieller Hinsicht vollständig interesselos, ob diese Schwelle tiefer oder höher liegt; der Fehler aber, einen schon schwach pathologischen Effekt noch für normales Verhalten zu nehmen, wäre in unseren Versuchen höchstens zeitlich ins Gewicht gefallen, da bei Verkennung der einen Blutprobe die nächste Blutentnahme uns ja deutlich genug orientieren konnte. Ein Auffassen von normal möglichen Serumfärbungen als pathologisch aber hätte einen tadelnswerten Fehler bezüglich der Deutung unserer Versuchsresultate bedingt.

Jedes Tier, das zur Blutuntersuchung nach erfolgter Infektion dienen soll, ist zunächst daraufhin zu untersuchen, ob

1. die Farbe seines Serums der normalen Farbe seiner Tierspezies entspricht,
2. ob sein Blut bezüglich der spontanen aseptischen Hämolyse sich so verhält, dafs das Serum nach 24stündigem Lagern der Blutprobe gegenüber der Farbe, die das Serum bei sofort nach erfolgter Entnahme ausgeführter Zentrifugierung aufwies, keinen nennenswerten Farbenunterschied zeigt.

Abweichen von der normalen Farbe kann durch Krankheitsprozesse (z. B. Ikterus) bedingt sein, eine innerhalb von 24 Stunden auftretende stärkere Lösung der Blutkörperchen im Serum etwa als Eigenschaft einer Spezies (Hund) kann hinsichtlich der Nachhämolyse zu groben Irrtümern verleiten.

So haben wir einmal bei dieser Vorprüfung eines Kaninchens eine ziemlich starke Hämoglobinämie gefunden. Erhebungen ergaben, dafs das Tier, am Versuchstage von auswärts zur Stadt gebracht, einen mehrstündigen Aufenthalt in einem Korbe auf offenem Schlitten bei einer Temperatur von —19° R (in der Stadt) hinter sich gehabt hatte. Am nächsten Tage war keine Hämoglobinämie mehr zu konstatieren, das Tier verhielt sich durchaus normal. Wir setzten dann ein anderes Kaninchen der herrschenden Temperatur von einigen Minusgraden durch 3—4 Stunden aus, ohne jedoch eine Hämoglobinämie zu erzielen und verfolgten dieses aufserhalb unseres Programmes liegende Thema nicht weiter.

Zeigt sich bei der Vorprüfung das Tier brauchbar, so wird es infiziert und dann zu verschiedenen Zeiten Blut entnommen (vgl. oben). Das gewonnene Blut wird aus dem blutenden Gefäfse direkt in unsere sterilen U förmigen Kapillaren einfliefsen gelassen, dann wird nach erfolgter Gerinnung der inzwischen formierte Blutfaden ausgezogen und die Röhrchen zentrifugiert.

Wir entnehmen, wenn nicht besondere Umstände mehr erheischen, jedesmal 4 Kapillaren. Zwei werden sofort — bzw. innerhalb von 30 Minuten — zentrifugiert, zwei werden gefüllt liegen gelassen und nicht später als höchstens 24 Stunden nach der Entnahme der Zentrifugierung unterworfen. Erstere Proben zeigen nun eine etwa bestehende Hämoglobinämie (beim lebenden oder eben verendeten Tiere) an, letztere dienen uns zum Nachweise einer eventuellen Nachhämolyse.

Es ist hier wohl angezeigt, auf den Begriff der Hämoglobinämie etwas näher einzugehen.

Nach den allgemein gültigen Anschauungen der Kliniker, die ja praktisch zunächst interessant sind, verstehen wir unter Hämoglobinämie das Auftreten von gelöstem Hämoglobin im

Blute. Die Methoden, welche von klinischer Seite (Vierordt, v. Jaksch) zur Konstatierung dieser Krankheitserscheinung angegeben werden, bestehen darin, dafs man das dem Kranken mittels Schröpfkopfes entnommene Blut 24 Stunden im Eisschranke stehen läfst und das nach dieser Zeit abgesetzte Serum rubinrot verfärbt findet. Wir sind, wie aus unseren in der Folge mitgeteilten Protokollen ersichtlich sein wird, heutzutage nicht mehr berechtigt, aus einer Beobachtung, die solange nach der erfolgten Blutentnahme gemacht wird, einen sicheren Schlufs darauf zu ziehen, dafs zur Zeit der Entnahme schon gelöstes Hämoglobin im Blute gekreist hätte. Es kann der Fall sein, aber es mufs durchaus nicht so sein. Die herkömmliche Methode der Konstatierung einer Hämoglobinämie ist durchaus zu verwerfen, wenn sie allgemeine Gültigkeit beanspruchen will, sie mag in manchen Fällen vielleicht richtige Resultate ergeben, bei Infektionskrankheiten ist sie nicht brauchbar, weil nach unseren Untersuchungen Blutsera infizierter Tiere, die, sofort nach der Entnahme zentrifugiert, normale Färbung zeigen, schon nach wenigen Stunden rötlich, ja weinrot sein können. Es war da also im lebenden Blute noch kein Hämoglobin in nennenswerten Mengen ausgetreten und keine Hämoglobinämie vorhanden gewesen; vielleicht war aber intra vitam eine Schädigung der Blutkörperchen schon da, welche sich dann aufserhalb des lebenden Körpers in der Lösung der Erythrozyten und Rotfärbung des Serums manifestierte. Wir möchten also den Begriff Hämoglobinämie fernerhin so aufgefafst wissen, dafs derselbe anzeigt, dafs eine dem lebenden Individuum oder sofort nach dem Tode entnommene, und möglichst sofort, längstens aber innerhalb von 30 Minuten zentrifugierte Blutprobe eine Rotfärbung des Serums ergiebt. Finden wir also im Kadaver bei der etwa einige Stunden post mortem vorgenommenen Sektion »Hämoglobinämie«, so müssen wir richtig sagen, es sei »Hämolyse.« Haben wir eine Probe sofort zentrifugiert und keine Lösung konstatiert, finden aber bei gleichzeitig entnommenen aber erst später zentrifugierten Proben dann Hämolyse, so bezeichnen wir diesen Vorgang als Nachhämolyse, ebenso wenn sich in Parallelproben von

solchen, die bei der Entnahme (z. B. sehr bald, aber nicht unmittelbar nach dem Tode) einen geringen Grad von Hämolyse gezeigt hatten, eine deutliche Zunahme der Färbungsintensität nachweisen läfst.

Wir waren, um zu klaren Resultaten in unseren Versuchen zu kommen, genötigt, den Tod der Versuchstiere abzuwarten und unmittelbar nach erfolgtem Tode die Sektion der Tiere und sofort die Blutuntersuchung vorzunehmen. So fanden wir, dafs bei sämtlichen Infektionsversuchen, mit Ausnahme der Milzbrandinfektionen und gewissen Fällen von Staphylokokkeninfektionen eine Hämoglobinämie (Hämolyse intra vitam) im allgemeinen nicht bestanden hat, da wir bei den sofort nach dem Tode entnommenen Blutproben das Serum normal fanden. In dieser Hinsicht ist in unserer seinerzeit über das gleiche Thema erfolgten vorläufigen Mitteilung[1]) der in herkömmlicher Weise angewendete Begriff Hämoglobinämie insbesondere dort in Hämolyse zu korrigieren, wo wir (S. 1119) sagen »von anderen Bakterienarten konnten wir konstatieren, dafs Hühnercholerabakterien beim Kaninchen (6 Fälle) durchaus Hämoglobinämie vom Typus serum purpureum zu erzeugen imstande waren.« Wir hatten ja bei den Sektionen der Tiere, die etwa in der Nacht verendet waren, »Hämoglobinämie« konstatiert, aber das Abwarten des Todes und die sofortige Untersuchung des Blutes, ein Verfahren, das zur theoretischen Begriffsformierung sich als unerläfslich herausstellte, zeigte uns später, dafs diese »Hämoglobinämie« nur als Hämolyse, genauer als Nachhämolyse aufgefafst werden darf.

Um nochmals kurz zusammenzufassen: Die intra vitam oder sogleich nach dem Tode mit einwandsfreier Methode sichergestellte Hämolyse ist Hämoglobinämie, die einige Zeit nach dem Tode erhobene »Hämoglobinämie« im bisher üblichen Sinne ist absolut genommen als Hämolyse, bzw. wenn man dem Umstande Rechnung trägt, dafs zur Zeit des Eintrittes des Todes keine oder eine quantitativ geringere Hämoglobinämie vorhanden war, als Nachhämolyse aufzufassen.

1) Münchner med. Wochenschrift, 1903.

Wir wollen nicht behaupten, dafs das in Lehrbüchern noch stehengebliebene Verfahren zur Konstatierung von Hämoglobinämie heute noch allgemein üblich sei, die moderne Zentrifuge wird wohl damit aufgeräumt haben, aber die Methoden werden in den Lehrbüchern weiter geführt und der alte Begriff der Hämoglobinämie ist erhalten geblieben.

Der Kliniker und der pathologische Anatom werden wohl nur selten in die Lage kommen, sofort nach dem Tode die Sektion vornehmen zu können, es werden daher unsere Untersuchungen, was die Befunde bei eben eingetretenem Tode anbelangt, am Menschen schwer ausführbar sein. Doch wird man auch für die menschliche Pathologie an dem Unterschiede zwischen Hämoglobinämie und Nachhämolyse festhalten müssen. Vielleicht bringt uns auch die Zukunft eine feinere Methode, die die Menge gelösten Blutfarbstoffes quantitativ zu bestimmen gestattet.

Vor Besprechung der einzelnen Infektionen wäre noch über einige Erfahrungen Mitteilung zu machen, die hinsichtlich allgemeiner Fragen aus dem Gebiete der Hämolyse nicht ohne Interesse sein dürften.

I. Über die Schädigung der Erythrocyten im Tierkörper als Folge der Einverleibung von in vitro erzeugtem Bakteriohämolysin. Über Bindung von Hämolysin im Tierkörper und im Reagensglas.

Versuche mit Staphylolysin am Kaninchen.

Es ist ein strenges Postulat der Ehrlichschen Theorie, dafs ein Bakteriohämolysin zur Entfaltung seiner Wirksamkeit an die roten Blutzellen gebunden werde, dafs also die haptophore Gruppe des Lysins die Verankerung an das Blutkörperchen bewerkstellige, während dann nach Ablauf einer gewissen Zeit die toxophore Gruppe durch Auflösen des Blutkörperchens bzw. nach Ehrlich durch Erwirken der Durchlässigkeit der diffusionsverhindernden Membran — Diskoplasma Ehrlichs — ihre Wirksamkeit äufsert.

Es war für uns natürlich wichtig, auch über diese Frage experimentell am Tiere orientiert zu sein, einmal weil ja die Reagensglasversuche, an denen diese Frage studiert worden ist, nicht auch unbedingte Gültigkeit für die komplizierten Verhältnisse im Tierkörper haben müssen, dann aber auch, weil diese Frage von Wichtigkeit für die Auffassung unserer Injektionsversuche ist, die Literatur aber eine genügende Orientierung nicht zu bieten vermag.

Es hat zwar Schur (a. a. O.), um ganz allgemein zu konstatieren, ob die Injektion von Hämolysin bei Kaninchen eine die Erythrozyten schädigende Wirkung ausübe, einige Versuche in dieser Richtung angestellt. Schur hat drei Kaninchen subkutan Staphylolysin injiziert und die Tiere nach 1, 2 bzw. 4 Tagen entblutet, von den Blutmengen sterile Aufschwemmungen in isotonischen Kochsalzlösungen angelegt und die Versuchsröhrchen neben den entsprechenden mit normalem Blute beschickten Kontrollen im Brutofen bei 30° aufbewahrt. Es zeigte nun nur das Blut jenes Tieres, welches nach Ablauf von 2 Tagen entblutet worden war, eine deutliche Lösung, während das Blut der beiden anderen Tiere sich wie normales Blut verhielt. Die Lösung im Reagensglas trat erst nach 2tägigem Verweilen im Brutschranke in Erscheinung. Die Reaktion verlief also sehr langsam. Bezüglich der beiden anderen negativ ausgefallenen Versuche kann man zur Erklärung annehmen, daſs vielleicht bei dem nach 24 Stunden getöteten Kaninchen die Wirkungszeit des Lysins zu kurz bemessen gewesen sei, beim anderen (4 Tage) ist die Möglichkeit vorhanden, daſs eine erfolgte Schädigung schon wieder ausgeglichen worden war.

Wir benutzten deshalb zum Studium dieser Frage den Weg, den Tieren das Lysin direkt in die Blutbahn zu injizieren. Um deutliche Resultate zu erhalten, verwendeten wir auch gröſsere Mengen Lysins (30 ccm) als Schur (0,5 ccm).

Wir injizierten einem Kaninchen 30 ccm eines Staphylolysins von Titer $Lo < 0{,}0125$, $Lc = 0{,}4$ ccm, zentripetal in die rechte Vena jugularis. 10 Minuten nach beendeter Operation wurde das Tier aus der linken Art. carotis entblutet, das Blut vorsichtig

defibriniert, sodann in mehrere Röhrchen zu je 2 ccm 0,85 proz. Kochsalzlösung je ein Tropfen des Blutes eingebracht, die Röhrchen 2 Stunden bei 37° C gehalten, in der Kälte aufbewahrt und nach 24 Stunden das Resultat notiert. Eine gleiche Anzahl von Proben wurde ohne Brutofenaufenthalt von vornherein in der Kälte gehalten, beiden Versuchen die entsprechenden Kontrollen beigegeben. Aufserdem wurde aktives und inaktives Serum des injizierten Tieres auf seine eventuelle Lösungsfähigkeit gegenüber Normalkaninchenblut geprüft. Tab. II macht das Resultat ersichtlich.

Tabelle II.

	Erst 2h bei 37° C, dann Kälte	Immer in der Kälte
2 ccm 0,85 proz. NaCl-Lösung + 1 Tropfen Blut (6 Röhrchen)	Lösung	Lösung
2 ccm 0,85 proz. NaCl-Lösung + 1 Tropfen normales Blut	0	0
2 ccm aktives Serum + 1 Tropfen normales Blut	0	0
2 ccm inaktives Serum + 1 Tropfen norm. Blut	0	0

Dieser nur zur Orientierung angestellte Versuch zeigt uns deutlich, dafs durch die Injektion von Staphylolysin im Gefäfssystem eines Kaninchens die roten Blutzellen derart alteriert waren, dafs sie der Auflösung anheimfallen.

Als wir kurz darauf denselben Versuch unter denselben Bedingungen wiederholten, zeigte das Blut des »Lysinkaninchens« in isotonischer Kochsalzlösung nach 24 Stunden noch keine Lösung; erst nach weiteren 24 Stunden Aufenthalts bei Zimmertemperatur konnten wir in den Röhrchen deutliche Rotfärbung der Flüssigkeit (»Kuppe«) konstatieren. Das defibrinierte Blut aber des Lysinkaninchens, das über Nacht in der Kälte aufbewahrt worden war, zeigte eine intensive Hämolyse, das abgesetzte Serum war purpurrot. Es war auffallend, dafs das geschädigte Blut in seinem eigenen Serum schon nach relativ kurzer Zeit selbst bei geringer Temperatur (ca. 10° C) der Auf-

lösung anheimgefallen war, während in dem nach der üblichen Technik mit demselben Blute angestellten Versuche erst nach ungefähr 48 Stunden eine nennenswerte Lösung eintrat.

Verschiedene Gründe konnten die Schuld daran tragen. Es konnte die starke Lösung im eigenen Serum dadurch erklärbar sein, dafs ja hier eine im Verhältnis viel gröfsere Anzahl von geschädigten Erythrozyten in der Flüssigkeit suspendiert ist, eine Annahme, durch die in einfacher Weise die gröfsere Menge ausgetretenen Hämoglobins ihre Erklärung findet. Im Reagensglas kommen ja auf 2 ccm isotonische Kochsalzlösung, also auf 40 Tropfen ein Tropfen Blut (1:40). Das Verhältnis von Blutkörperchen zum Serum stellt sich im defibrinierten Blute des Kaninchens nach Abderhalden (12) wie 372,1 : 627,9 also ungefähr wie 1 : 1,68.

Anderseits konnte ja das Serum des Lysinkaninchens an und für sich ein besseres Lösungsmittel überhaupt, auch vielleicht deshalb sein, weil in demselben möglicherweise noch eine grofse Menge des injizierten Lysins vorhanden gewesen sein konnte, welche dann beim Stehen noch zur Geltung kam. Wenn auch im oben zitierten orientierenden Versuche das aktive Serum des Lysinkaninchens Normalkaninchenblut nicht gelöst hatte, so hielten wir es doch nicht für überflüssig, der Frage genauer nachzugehen, ob im Serum eines mit Lysin intravenös injizierten Kaninchens ungebundenes Lysin noch vorhanden sein könne.

Theoretisch konnten wir diesen Einwand nicht für gut fundiert halten. Denn ebenso wie wir vom Lysin verlangen, dafs es elektiv (wenigstens nach dem heutigen Stande unserer Kenntnisse) an die roten Blutzellen verankert werde, so müssen wir theoretisch fordern, dafs so lange kein freies Lysin im Serum sich befinden dürfe, als noch mit Lysin nicht abgesättigte Erythrozyten vorhanden sind. Erst aber wenn die Menge des injizierten Lysins die Aufnahmsfähigkeit, den Bindungswert der Erythrozyten überstiege, dürften wir erwarten, freies, ungebundenes Lysin im Serum zu finden; natürlich sofern Lysin nicht etwa auch von anderen Körperzellen gebunden werden kann. Über letzteren Fall sind uns zurzeit aber noch keine Beobach-

tungen bekannt und wollen wir diese Möglichkeit vorderhand nicht weiter in Betracht ziehen.

Wir hatten also zu prüfen, ob das Serum eines Kaninchens, dem Lysin in die Blutbahn eingebracht wurde, gegenüber normalem Kaninchenblut eine lösende Wirkung besitze. Die zu injizierende Lysinmenge ist natürlich so zu wählen, dafs ihr austitriertes hämolytisches Vermögen kleiner ist als die voraussichtliche Bindungsfähigkeit, welche die Blutmenge des Versuchstieres repräsentiert.

Ein Kaninchen von 1720 g erhält 30 ccm Staphylolysin vom Titer 0,4 = Lc in die rechte V. jugularis. 20 Minuten nach Beendigung der Operation wird das Tier aus der linken A. carotis entblutet, das Blut defibriniert und teils zur Serumgewinnung, teils zum Lösungsversuche verwendet.

Wie wir aus den folgenden Tabellen ersehen, hatte in der Tat das Serum des Lysinkaninchens auf normale Kaninchenerythrozyten keine lösende Wirkung ausgeübt, während das Lysinblut in isotonischer Kochsalzlösung sich löste, also bewies, dafs die Bindung des Lysins an die Erythrozyten erfolgt war. Freies Lysin im Serum war also nicht vorhanden gewesen.

Tabelle III.

2 ccm Lysinserum aktiv + normales Kaninchenblut	0
2 ccm Lysinserum aktiv + Lysinblut	+
2 ccm Lysinserum aktiv. Farbenkontrolle.	
2 ccm Lysinserum inaktiv + normales Kaninchenblut	0
2 ccm Lysinserum inaktiv + Lysinblut	+
2 ccm Lysinserum inaktiv. Farbenkontrolle.	
2 ccm normales Kaninchenserum I aktiv + normales Kaninchenblut II	0
2 ccm normales Kaninchenserum I aktiv + Lysinblut	+
2 ccm normales Kaninchenserum I aktiv. Farbenkontrolle.	
2 ccm normales Kaninchenserum I inaktiv + normales Kaninchenblut II	0
2 ccm normales Kaninchenserum I inaktiv + Lysinblut	+
2 ccm normales Kaninchenserum I inaktiv. Farbenkontrolle.	
2 ccm 0,85 proz. NaCl-Lösung + normales Kaninchenblut I	0
2 ccm 0,85 proz. NaCl-Lösung + normales Kaninchenblut II	0
2 ccm 0,85 proz. NaCl-Lösung + Lysinblut	+

Lysinserum: Serum des mit Staphylolysin injizierten Kaninchens.
Lysinblut: Blut desselben.
+: Lösung.
0 : Keine Lösung.

Tabelle IV.

Lösung des Lysinblutes in isotonischer Kochsalzlösung. Bestimmung mit dem Hämometer nach Fleischl.

0,85 proz. Na Cl-Lösung ccm	Zugesetzte Tropfenzahl des Blutes	Hämometerzahlen
2	1	932
2	3	2344
2	5	4035
2	10	7780
2	3 Tropfen normales Blut	keine Lösung

Die Hämometerzahlen sind mg Hämoglobin in 1000 ccm.

Man könnte nun einwenden, dafs in Tabelle III eine Lösung der normalen Kaninchenerythrozyten im Lysinserum deshalb nicht erfolgt sei, weil das Lysin durch Mischung mit dem Blute des Versuchstieres eine derartige Verdünnung erfahren habe, dafs eine lytische Wirkung schon aus diesem Grunde ausgeblieben wäre. Eine einfache Rechnung wird nun zeigen, dafs der Einwand nichtig sei.

Das verwendete Kaninchen wog 1720 g. Nach den Angaben der Physiologie beträgt die Blutmenge des Kaninchens $^1/_{19}$ seines Körpergewichtes. Unser Versuchstier hatte also 90 g Blut besessen. Zu diesen 90 g, die wir der Einfachheit halber gleich 90 ccm setzen wollen, kamen 30 ccm injiziertes Lysin vom Titre $L_c = 0,4$ ccm. Wir hatten also eine Flüssigkeitsmenge von 120 ccm und wollen ganz davon absehen, dafs dieselbe gewifs durch regulatorische Vorgänge von seiten des Organismus vermindert worden war. Die 120 ccm enthielten 30 ccm Lysin, also im ccm 0,25 oder in 2 ccm der im Versuch verwendeten Menge von Serum 0,5 ccm Lysin. Da nun der Titer unseres Lysins $L_c = 0,4$ war, also 0,4 ccm unseres Lysins einen Tropfen Kaninchenblutes komplett löste, so müfsten ja doch 2 ccm Serum mit einem ausgerechneten Gehalte von 0,5 ccm Lysin, also noch mehr als L_c gewifs eine lytische Wirkung gehabt haben, wenn eben noch freies Lysin in der Mischung vorhanden gewesen wäre.

Wir können also mit Fug und Recht annehmen, dafs im Serum kein freies Lysin vorhanden gewesen sei, ohne dafs eine Verdünnung für die ausbleibende Lösung verantwortlich zu machen gewesen wäre.

Als wir nun gesehen hatten, dafs im Tierkörper die vollständige Bindung des Lysins in äufserst prompter Weise vor sich gehe, wollten wir noch feststellen, wie sich denn die Bindungsverhältnisse in vitro stellen mögen, denn wir wissen ja seit den Versuchen von Madsen mit dem Tetanolysin, dafs der Nachweis einer solchen Bindung zu gelingen pflegt. Hier war gleichfalls das theoretische Postulat aufrechtzuerhalten, dafs bei entsprechender Bindung von seiten der Blutkörperchen die nach dem Zentrifugieren abgesetzte Flüssigkeit, das Absorbat, keine lösende Wirkung mehr auf rote Blutzellen ausüben dürfe. Bedient man sich bei solchen Bindungsversuchen nicht der Methode von Sachs ([13]), so ist es mitunter unvermeidlich, dafs infolge bereits eingetretener Lyse eine Rotfärbung des Absorbats eintritt, welche uns dann bei der Auswertung des Lösungsvermögens natürlich hindernd in den Weg tritt. Um da die Lösungskraft des Absorbates einwandsfrei feststellen zu können, sieht man sich genötigt, zunächst die Hämometerzahlen des Absorbates in den dem wirklichen Versuche entsprechenden Verdünnungen, natürlich ohne Blutzusatz, festzustellen. Stellt man dann den Versuch mit dem Absorbate und Blutkörperchen an (je ein Tropfen Blut in jedes Röhrchen) und bestimmt nun die Hämometerzahlen der einzelnen Röhrchen, so mufs ein Steigen der Zahlen im Absorbatversuch zugunsten eingetretener Lösung sprechen, uns also anzeigen, dafs unser Absorbat eben nicht frei von Lysin gewesen ist. Differieren die Hämometerzahlen des Versuches nicht wesentlich gegenüber den Zahlen des Absorbates, so kann man annehmen, dafs eine vollständige Bindung des Lysins stattgefunden habe. Schwankungen von 10 Graden beim Fleischlschen Hämometer liegen wohl innerhalb der möglichen Fehlergrenzen und sind erst Differenzen über 10 von Bedeutung. Wir kamen gar nicht in die Lage, diese Erfahrung praktisch verwerten zu können, da in unseren Versuchen die geringste mefsbare Differenz

zwischen Absorbatzahl und der im Versuche erhobenen Zahl 17 betrug.

Von Wichtigkeit ist, bei solchen Versuchen darauf zu sehen, dafs dem Lysin eine solche Blutmenge zugesetzt wird, dafs dem Titer des Lysins entsprechend ein Überschufs an Blut vorhanden sein mufs. Wenn wir z. B. (Tab. V Versuch I) 9 ccm eines Lysins vom Titer 0,4 = L_c absättigen wollen, so müssen wir theoretisch den Lösungswert der 9 ccm mit mindestens $\frac{9}{0,4}$ also 22,5 Tropfen berechnen, da ja 0,4 ccm des Lysins einen Tropfen Blut komplett zu lösen vermögen. Wenn wir nun statt 22,5 etwa 50—60 Tropfen Kaninchenblut zusetzen, so können wir wohl annehmen, dafs ein Überschufs von Blut vorhanden sei. Die folgenden Tabellen registrieren die unter verschiedenen Bedingungen angestellten drei Bindungsversuche.

Tabelle V. Versuch I.

9 ccm Staphylolysin vom Titer 0,4 = Lc + 2,8 ccm = 56 Tropfen Kaninchenblut werden bei Zimmertemperatur gemischt und 24 Std. bei 10° C gehalten. Absorbat dunkelrot. Gewöhnliche Technik der Auswertung eines Lysins. Die Hämometerzahlen geben an wieviel mg Hämoglobin in 1000 ccm der Blutlösung enthalten waren.

Absorbatmenge in 2 ccm	0,85 proz. Na Cl-Lösung in 2 ccm	Hämometerzahlen		Zunahme des Hämoglobingehaltes in %
		vor dem Versuche	nach dem Versuche	
1,00	1,00	4425	4612	4
0,60	1,40	3000	3802	27
0,40	1,60	2112	2450	16
0,20	1,80	914	1612	76
0,10	1,90	537	759	41
0,05	1,95	259	422	62
0,0125	1,987	< 96	< 96	—

(Siehe Tabelle VI und VII auf S. 207.)

Wenn wir die Resultate der vorstehenden Versuche überblicken, so konstatieren wir als allen gemeinsam die Tatsache, dafs in keinem derselben eine vollständige Bindung des Lysins an die im Überschufs zugesetzten Blutmengen erfolgt war, nachdem ja immer das Absorbat auf Zusatz von 1 Tropfen Blut hin

Tabelle VI. Versuch II.

20 ccm Staphylolysin vom Titer 0,4 = Lc werden mit 150 Tropfen = 7,5 ccm Kaninchenblut gemischt und 30 Minuten bei 37° C gehalten. Absorbat purpurrot. Gewöhnliche Technik der Auswertung eines Lysins.

Absorbatmenge in 2 ccm	0,85 proz. Na Cl-Lösung in 2 ccm	Hämometerzahlen vor dem Versuche	Hämometerzahlen nach dem Versuche	Zunahme des Hämoglobingehaltes in %
0,8	1,2	3460	4770	37
0,6	1,4	3690	4192	13
0,4	1,6	2460	3285	33
0,2	1,8	951	2245	136
0,15	1,85	845	2385	182
0,10	1,90	691	1534	122
0,05	1,95	326	624	91
0,025	1,975	250	374	49
0,0125	1,9875	< 96	298	—

Tabelle VII. Versuch III.

16 ccm Staphylolysin vom Titer 0,4 = Lc und 5 ccm = 100 Tropfen Kaninchenblut werden gesondert, 1 ½ Std. bei 37° C vorgewärmt, dann vereinigt und weitere 3 Std. bei 37° C gehalten. Absorbat rubinrot. Flüssigkeit steril.

Absorbatmenge in 2 ccm	0,85 proz. Na Cl-Lösung in 2 ccm	Hämometerzahlen vor dem Versuche	Hämometerzahlen nach dem Versuche	Zunahme des Hämoglobingehaltes in %
2	0	2422	3114	28
1	1	1326	1956	47
0,8	1,2	1000	1384	38
0,6	1,4	615	920	49
0,4	1,6	471	1080	129
0,2	1,8	172	711	313
0,1	1,9	< 96	615	—
0,05	1,95	< 96	259	—
0,025	1,975	< 96	< 96	—
0,0125	1,987	< 96	< 96	—

ansteigende Hämometerzahlen zeigt, also das Absorbat noch Bindungs- und Lösungsvermögen besafs. Wenn wir schon bei Versuch I (Tab. V) a priori nicht angenommen hatten, dafs bei der niedrigen Temperatur eine vollständige Bindung erfolgen werde, auch noch zugeben wollen, dafs in Versuch II (Tab. VI) die Zeit von 30 Min. nicht lange genug bemessen gewesen wäre, um den gewünschten

Effekt zu erzielen, so mufste uns doch in hohem Mafse befremden, dafs auch die in Versuch III (Tab. VII) angewandten Zeiten: eineinhalbstündiges Vorwärmen, dann Verweilen der Mischung durch 3 Stunden bei 37° C nicht genügt hatten, um eine vollständige Bindung zu erzielen.

Ziehen wir nun in Betracht, dafs nach unseren weiter oben mitgeteilten Erfahrungen im Tierkörper sicher 20 Minuten, ja auch schon 10 Minuten nach vollendeter intravasaler Injektion des nicht vorgewärmten Lysins die Bindung vollzogen war, so müssen wir zugeben, dafs die Reagensglasversuche dem Tierversuch gegenüber ein recht kümmerliches Surrogat bedeuten; wenn aber im Tierkörper etwa noch andere Zellenelemente eine Affinität für Bakteriolysine besitzen sollten, so würde dieser Umstand erst recht einen Vergleich zwischen Reagensglas- und Tierversuch verbieten müssen.

II. Über die Wirkung des Staphylolysins im Tierkörper bei subkutaner, intraperitonealer oder intravenöser Einverleibung.

Im vorigen Abschnitte haben wir den Nachweis erbracht, dafs man nach intravenöser Injektion von Staphylolysin eine Lösung des Blutes des vergifteten Kaninchens sowohl in seinem eigenen als auch im Serum der homologen Tierart beobachten könne, sowie dafs eine Lösung zum Unterschiede von normalem Kaninchenblut auch in isotonischer Kochsalzlösung erfolge. Wir konnten zeigen, dafs die Bindung zwischen Lysin und Erythrozyten im Tierkörper in weitaus vollkommenerer Weise zu bewirken und nachzuweisen sei als im Reagensglasversuch. Aber unsere Versuchsanordnung mufste es mit sich bringen, das vergiftete Tier zu entbluten, und somit wurde es uns unmöglich, den zeitlichen Verlauf einer solchen Vergiftung in ihrer Einwirkung auf das Blut zu studieren. Diese Lücke auszufüllen sind die folgenden Versuche berufen.

Wir bedienten uns hierbei unserer Kapillarmethode, welche sich aufs beste bewährte und vor allem in den Versuchen schön zur Darstellung bringt, wie wichtig es ist, die Konstatierung der Nachhämolyse zur Beobachtung heranzuziehen, da uns ohne

diesen Behelf mancher wertvolle Aufschlufs verborgen bleiben würde (vgl. Nr. 178 u. 193).

Wir injizierten den Kaninchen das Staphylolysin zunächst subkutan. Das Auftreten einer Hämoglobinämie wurde bei diesem Vorgehen nicht beobachtet (vgl. Tab. VIII u. IX). Die Proben, welche sofort nach der Entnahme zentrifugiert worden waren, liefsen ausnahmslos eine Hämolyse vermissen, jedoch zeigten viele Proben deutliche Nachhämolyse. Die Beeinflussung der roten Blutzellen ist durch mehrere Tage hindurch deutlich wahrnehmbar, in Tabelle VIII ist am 4. Tage, in Tabelle IX am 7. Tage noch Nachhämolyse zu beobachten. Bei der zweiten Injektion bei Nr. 178 wird keine Schädigung der Erythrozyten mehr wahrnehmbar, das Tier ist offenbar bereits immun geworden.

Tabelle VIII.

Kaninchen Nr. 193. Subkutane Injektion von Staphylolysin.

Datum	Gewicht der Entnahme	Zeit der Entnahme	H	NH	
15. III. 04	1172	Kontrolle	—	—	Injektion von 10 ccm Staphylolysin. Staph. 88 vom Titre Lo < 0,02, Lc zwischen 0,2 und 0,06. Infiltrat. Nekrose. Schorf. Heilung.
Injektion 12h 30'		4h	—	—	
16. III.	1087	10h 30'	—	+	
17. III.	995	11h 30'	—	+	
		12h 30'	—	+	
18. III.	1005	11h 15'	—	—	
19. III.	1045	11h 15'	—	+	
21. III.	1080	10h	—	—	

(Siehe Tabelle IX auf Seite 210.)

Anders wiederum liegen die Verhältnisse bei intraperitonealer Einverleibung des Lysins. Hier sehen wir in jedem der beiden mitgeteilten Fälle überhaupt nur je einmal eine Schädigung der Erythrozyten zum Ausdruck kommen und zwar als Nachhämolyse wie bei der subkutanen Applikation. Die eine Beobachtung (Nr. 194) ist einwandsfrei, bezüglich der anderen (Nr. 177) sagt uns schon das Zeichen $\pm$, dafs die Hämolyse durchaus nicht von zweifelloser Intensität gewesen ist. Im Gegensatze zu den subkutan injizierten Tieren trat hier das Manifestwerden der Schädigung in beiden Fällen schon am Tage nach der Injektion

auf. Dann aber konnte keine Lösung mehr beobachtet werden. Bei Nr. 177 trat auf eine zweite Injektion hin der Tod ein. Bei der Sektion fanden wir das Serum durch Hämoglobin gefärbt. Diese Hämolyse, die in der Folge keine Verstärkung in ihrer Intensität erfuhr, war quantitativ zur Zeit, als wir das Tier sezierten, bereits abgelaufen.

Tabelle IX.

Kaninchen Nr. 178. Subkutane Injektion von Staphylolysin. Immunität.

Datum	Zeit	Gewicht	H	NH	
	der Entnahme				
22. I. 04	Kontrolle	1575	—	—	I. Injektion 10 ccm Staphylolysin. Staph. 88 vom Titre Lo $<$ 0,02, Lc zwischen 0,5 und 01.
I. Injektion 12^h 15'	12^h 30'		—	—	
	4^h 30'		—	—	
23. I.	12^h 15'	1505	—	—	
25. I.	11^h 30'	1430	—	±	2 Tage nach der Injektion beginnende Nekrose der Injektionsstelle, Demarkation, Schorf. Heilung.
26. I.	12^h 30'	1375	—	+	
27. I.	11^h 15'	1310	—	+	
29. I.	12^h 15'	1144	—	±	
11. III. 04	Kontrolle	1380	—	—	II. Injektion 7 ccm Staphylolysin. Staph. 88. Titre Lo $<$ 0,02, Lc zwischen 0,2 und 0,06.
II. Injektion 1^h 15'	5^h 15'		—	—	
12. III.	11^h 30'	1332	—	—	Keine Reaktion an der Injektionsstelle. Geringe Gewichtsabnahme, die schon am 3. Tage ausgeglichen erscheint.
13. III.	5^h	1322	—	—	
14. III.	11^h	1382	—	—	
15. III.	—	1385	—	—	

Tabelle X.

Kaninchen Nr. 194. Intraperitoneale Injektion von Staphylolysin.

Datum	Zeit der Entnahme	H	NH	
14. III. 04	Kontrolle	—	—	Anfangsgewicht 1360 g, erhält 10 ccm Filtrat einer 11 Tage alten Bouillonkultur Stamm Staph. 88, Titre Lo unter 0,02, Lc zwischen 0,2 und 0,06; nimmt stetig ab und wird am 15. IV. bei einem Gewicht von 905 g getötet.
Injektion 12^h	12^h 15'	—	—	
	1^h	—	—	
	6^h 30'	—	—	
15. III.	11^h 30'	—	+	
16. III.	12^h 30'	—	—	
17. III.	12^h	—	—	

Tabelle XI.

Kaninchen Nr. 177. Intraperitoneale Injektion von Staphylolysin. Tod.

Datum	Zeit der Entnahme	H	NH	
21. I. 04	Kontrolle	—	—	Anfangsgewicht 975 g.
I. Injektion				I. Injektion 10 ccm Filtrat einer 13 Tage
um 12^h				alten Bouillonkultur Stamm Staph. 88.
	12^h 15'	—	—	Titre Lo unter 0,02, Lc zwischen 0,5
	5^h	—	—	und 0,1.
22. I.	11^h 30' Vm.	—	± ?	Gewicht sinkt bis zum 30. I. auf 870 g,
	4^h 30' Nm.	—	—	steigt dann wieder an. Das Tier wiegt
23. I.	12^h 10'	—	—	am 11. III. 1107 g.
11. III.	Kontrolle	—	—	II. Injektion 7 ccm Filtrat einer 11 Tage
II. Injektion				alten Bouillonkultur Stamm Staph. 88.
1^h 15'				Titre Lo unter 0,02, Lc zwischen 0,2
				und 0,06.
	5^h 15'	—	—	Tod in der Nacht zum 12. III. Sektion
	Sektion	+	—	am 13. III. 7^h p. m.
				Im Bauchraum hellrotes Serum, in der Pleurahöhle viel helles seröses Exsudat, im Herzbeutel ebenfalls viel helles Exsudat mit frischen fibrinös. Auflagerungen.
				Kultur Bauchexsudat, Pleuralexsudat, Herzblut, Leber } steril.

Gänzlich anders als bei der subkutanen oder intraperitonealen Injektion gestaltet sich die intravenöse Einverleibung des Lysins. Hier tritt entweder eine Hämoglobinämie oder wenigstens Nachhämolyse schon kurze Zeit nach der Injektion in Erscheinung. So bei Nr. 192 schon zehn Minuten nach der Injektion Hämoglobinämie, Nachhämolyse bei Nr. 182 nach 15 Minuten. In beiden Fällen aber finden wir schon in sehr kurzer Zeit den ganzen Prozefs abgelaufen, bei Nr. 182 schon nach 5 Stunden das Blut ohne freies Hämoglobin, bei Nr. 192 ist dies sicher nach 7 Stunden der Fall. Da beide Male auch keine Nachhämolyse nachweisbar ist, so können wir annehmen, dafs zu den angegebenen Zeiten keine geschädigten Erythrozyten mehr kreisten.

Wie wir bei Nr. 182 sehen, hat das Tier auf die zweite intravenöse Injektion kaum mehr reagiert (± N H), nach der dritten In-

jektion ist gar kein Einflufs auf die Erythrozyten mehr zu sehen, es war Immunität eingetreten.

Tabelle XII.

Kaninchen Nr. 192. Intravenöse Injektion von Staphylolysin.

Datum	Gewicht	Zeit der Entnahme	H	NH	
12. III. 04	1550	Kontrolle	—	—	Injektion von 7 ccm Staphylolysin Staph. 88. Titre Lo < 0,02, Lc zwischen 0,2 und 0,06.
Injektion 12h 45'					
		12h 55'	+	+	
		1h 15'	+	+	
		4h 45'	—	±	
		7h	—	—	
13. III.	1435	11h 30'	—	—	
14. III.	1465	11h 45'	—	—	

Tabelle XIII.

Kaninchen Nr. 182. Intravenöse Injektion von Staphylolysin. Immunität.

Datum	Gewicht	Zeit der Entnahme	H	NH	
29. I. 04	1827	Kontrolle	—	—	I. Injektion 10 ccm Staphylolysin Staph. 88. Titre Lo < 0,02, Lc = 0,2.
I. Injektion		12h 05'	—	+	
11h 50'		12h 50'	—	+	
		4h 50'	—	—	
30. I.	1820	11h 30'	—	—	
1. II.	1805	11h 30'	—	—	
11. III.	1795	Kontrolle	—	—	II. Injektion 7 ccm Staphylolysin Staph. 88. Titre Lo < 0,02, Lc zwischen 0,2 und 0,06.
II. Injektion		11h 45'	—	± ?	
11h 30'		12h 30'	—	± ?	
		5h 30'	—	—	
12. III.	1772	11h 30'	—	—	
13. III.	1800	11h 30'	—	—	
14. III.	1820	11h 15'	—	—	
2. IV.	1790	Kontrolle	—	—	III. Injektion 10 ccm Staphylolysin Staph. 88. Titre Lo < 0,02, Lc 0,1.
III. Injektion		11h 08'	—	—	
10h 53'		11h 38'	—	—	
		11h 53'	—	—	
		2h 53'	—	—	
		4h 53'	—	—	

Es scheint uns hier nötig, darauf hinzuweisen, dafs Neifser und Wechsberg (14) in ihrer noch mehrfach zu zitierenden Arbeit angeben, dafs ihnen die Erzeugung eines Antistaphylolysins am besten bei subkutaner Einverleibung gelungen sei; die intravenöse Injektion hätte sich entschieden als unzuverlässiger gezeigt als jene und nur in einem Falle ist es den Autoren gelungen, durch intravenöse Injektion ein »Antitoxin mäfsiger Stärke« zu erzeugen, die intraperitoneale Immunisierung aber hätte den Autoren mehrfach versagt. Letztere Angabe konnten wir nicht nachprüfen, da unsere intraperitoneal injizierten Tiere den absichtlich hoch bemessenen Dosen erlagen, während die mit gleichen Dosen subkutan und intravenös vorbehandelten Kaninchen nur vorübergehend im Gewicht abfielen und eine vollkommene Immunität erlangten. Einen Unterschied aber in der Stärke der auf dem einen oder anderen der beiden Wege erlangten Immunsera konnten wir nicht beobachten, die intravenöse Immunisierung leistete nicht weniger als die subkutane, wie die beiden folgenden Tabellen zeigen mögen. Die Immunsera wurden mit den Lysinmengen gemischt, eine Stunde bei 37 ° C gehalten, sodann erst jedem Röhrchen ein Tropfen normalen Kaninchenblutes zugefügt und nach üblicher Methode beobachtet.

Tabelle XIV.

Titer des Antistaphylolysins des Kaninchens Nr. 178 (subkutane Injektion).

Staphylolysin	Antitoxin (Serum)	0,85 proz. NaCl-Lösung	Lösung + keine Lös. 0
0,5	0,5	1	0
0,5	0,4	1,1	0
0,5	0,3	1,2	0
0,5	0,2	1,3	0
0,5	0,1	1,4	0
0,5	0,08	1,5	0
0,5	0,06	1,5	+
Kontrolle	0,5	1,5	0
Kontrolle	—	2	0

Tabelle XV.

Titer des Antistaphylolysins des Kaninchens Nr. 182 (intravenöse Injektion).

Staphylolysin	Antitoxin (Serum)	0,85 proz. Na Cl-Lösung	Lösung + keine Lös. θ
0,5	0,5	1	θ
0,5	0,4	1,1	θ
0,5	0,3	1,2	θ
0,5	0,2	1,3	θ
0,5	0,1	1,4	θ
0,5	0,08	1,5	θ
0,5	0,06	1,5	θ
0,5	0,05	1,5	+
0,5	0,03	1,5	+
0,5	0,01	1,5	+
0,5	0,005	1,5	+
Kontrolle	0,5	1,5	θ
Kontrolle	—	2	θ

III. Über die Resistenz normaler Kaninchenerythrocyten gegenüber Staphylolysin.

Das Vorhandensein von Antihämolysin in normalen Tierseris ist eine von allen Beobachtern, die über Hämolysine gearbeitet haben, mit grofser Einhelligkeit berichtete Tatsache, ebenso wird über grofse Schwankungen im Antihämolysin konstant Mitteilung gemacht. Neisser und Wechsberg (l. c.) haben gelegentlich ihrer Untersuchungen über das Staphylotoxin natürlich auch das Verhalten normaler Erythrozyten (gewaschen und ungewaschen) dem Staphylolysin gegenüber geprüft. Sie fanden, dafs die Empfindlichkeit der genuinen Kaninchenerythrozyten sich nicht unterschied von der der gewaschenen. Diese Eigenschaft des normalen Kaninchenblutes, in seinem Serum keinen Antikörper gegen das Staphylotoxin zu beherbergen, hatte es zur Folge, dafs mit Staphylolysin arbeitende Untersucher mit Vorliebe Kaninchenblut benutzen, weil man der immerhin zeitraubenden Aufgabe, die roten Blutzellen vor der Verwendung waschen und so vom Serum befreien zu müssen, gänzlich überhoben wird.

Eine zweite Versuchsreihe der genannten Forscher zeigte, dafs bei Einstellung eines Toxins gegen Blutkörperchen verschiedener Kaninchen bei gleichem Lc-Wert der Wert für Lo sehr verschieden liegen kann. Neisser und Wechsberg erklären diese Tatsache damit, dafs ja nicht alle Erythrozyten gleich empfindlich gegen das Staphylolysin zu sein brauchen, dafs stets eine gewisse Menge von widerstandsfähigeren roten Blutzellen vorhanden sei, welche den Wert Lc des Toxins bestimmen, dafs aber anderseits sehr empfindliche Erythrozyten, von deren Lösung der Wert Lo abhängt, nicht immer vorhanden sein müssen.

Als wir ein Staphylolysin, das zur Austitrierung eines Antitoxins bestimmt war, auf seine Lösungsfähigkeit prüften, bemerkten wir, dafs in unserem Auswertungsversuch der Wert Lc überhaupt nicht erreicht wurde, was uns umsomehr überraschte, als wir unter Einhaltung der gleichen Kulturbedingungen mit dem betreffenden Staphylokokkenstamme immer einen Wert von Lc nicht über 0,2 erhalten hatten.

Da wir überhaupt den Verdacht hegten, es könne doch vielleicht etwa als individuelle Eigenschaft mitunter im Serum der Kaninchen ein Antikörper normalerweise vorhanden sein, so hatten wir, wie immer bei wichtigeren Versuchen, so auch diesmal den Versuch mit gewaschenen und ungewaschenen Erythrozyten vorgenommen. Das absolut gleiche Verhalten beider bewies a priori, dafs es sich hier hinsichtlich der äufserst geringen Wirkung des verwendeten Lysins keineswegs um eine Herabsetzung der lytischen Kraft desselben durch einen normalerweise im Serum vorhandenen Antikörper handeln könne, und wir vermuten eine abnorme Resistenz der Erythrozyten als Grund der mangelhaften Lösung.

Das Experiment gab uns recht.

Wir stellten sofort einen zweiten Versuch mit gewaschenen Erythrozyten eines zweiten Kaninchens und demselben Lysin an und erhielten diesmal einen Wert von Lc $< 0{,}06$, während, wie oben bemerkt, im anderen Versuche Lc überhaupt nicht erreicht worden war.

Tabelle XVI.

Staphylolysin D in 2 ccm	0,85 proz. Na Cl-Lös. in 2 ccm	Erythrozyten Kaninchen I gewaschen	Erythrozyten Kaninchen I ungewaschen	Kaninchen II gewaschen
2	0	stark rot, kleine Linse[1])		rot, nicht agglut. Linse
1	1	do.		komplett
0,8	1,2	do.		do.
0,6	1,4	do.		do.
0,4	1,6	stark rot, grofse Linse		do.
0,2	1,8	do.		do.
0,1	1,9	do.		do.
0,08	1,92	do.		do.
0,06	1,94	do.		do.

Dieses Resultat steht in gewaltigem Widerspruche zur Behauptung von Neisser und Wechsberg, die sagen, dafs »die Blutkörperchen verschiedener Kaninchen bezüglich der Grenze komplette Lösung erhebliche Schwankungen in ihrer Empfindlichkeit nicht aufwiesen.« Der Abstand der Werte Lc $< 0{,}06$ bei Kaninchen II und Lc auch in 100proz. Konzentration im reinen unverdünnten Staphylolysin bei Kaninchen I überhaupt nicht erreicht, ist wohl so grofs, dafs die Gültigkeit des Ausspruches von Neisser und Wechsberg fernerhin nicht mehr aufrechterhalten werden kann.

Eine Erklärung für dieses ungleiche Verhalten des Blutes zweier verschiedener Individuen derselben Spezies gegen ein und dasselbe Lysin ist nicht so leicht zu geben. Wir können nur sagen, dafs viele der Blutkörperchen des Kaninchens I eine ganz besondere Resistenz besessen haben müssen, nach der Ehrlichschen Theorie ausgedrückt, dafs vielen Erythrozyten einfach das Vermögen abgegangen sein müsse, Lysin zu binden. Den Chemismus dieser Erscheinung aber aufzuklären, wird späteren Zeiten vorbehalten sein müssen.

1) Der Ausdruck Linse bezieht sich auf die am Boden in Linsenform liegenden, meist agglutinierten Blutkörperchen.

IV. Über die Resistenz der Erythrocyten mit Staphylolysin immunisierter Kaninchen gegen Staphylolysin.

Die auffallende Resistenz, welche die normalen Blutkörperchen in Tabelle XVI gezeigt hatten, veranlafste uns, Untersuchungen darüber anzustellen, ob denn bei immunisierten Tieren die Immunität gegen weitere Injektionen von Lysin lediglich als Serumwirkung aufzufassen sei, oder ob vielleicht neben derselben auch eine gesteigerte Resistenz der serumfreien Erythrocyten zu beobachten sein werde.

Injiziert man normalen Kaninchen Staphylotoxin in eine Vene, so kommt es zur Hämolyse, die sich entweder als Hämoglobinämie oder als Nachhämolyse äufsert. Wiederholt man nach einiger Zeit solche Injektionen, so kommen wir zu dem Resultate, dafs eine Lösung der Erythrocyten nicht mehr stattfindet, das Tier ist immun geworden, was die Hämolysierung seines Blutes anbelangt. Das Serum der Immuntiere ist in vitro imstande, die Wirkung von Staphylolysin auf Erythrocyten zu paralysieren und so vor der Auflösung zu schützen. Solche Versuche sind in genügender Anzahl gemacht worden, aber über das Verhalten der Erythrocyten der immunisierten Tiere sind uns Angaben in der Literatur bisher nicht vorgelegen.

Wir verwendeten zu den entsprechenden Versuchen das Blut von zwei Kaninchen, die durch subkutane und durch intravenöse Einverleibung entsprechender Lysinmengen immunisiert worden waren. Der Antitoxingehalt der Sera dieser Tiere war so grofs, dafs die Einheit des Serums die Wirkung der zehnfachen Menge Staphylolysins aufzuheben imstande war. Das defibrinierte Blut der Tiere, bzw. die gewaschenen Erythrocyten wurden in der Weise geprüft, wie man einen Auswertungsversuch mit einem zu untersuchenden Lysin anstellt, die erhaltenen Resultate illustrieren die folgenden Tabellen.

(Siehe Tabelle XVII und XVIII auf S. 218.)

Ein kurzer Blick genügt nun, um zu ersehen, dafs die Erythrocyten der Immuntiere durchaus keine Resistenz gegen die Wirkung des Lysins aufzuweisen haben, in beiden Versuchen

Tabelle XVII.
Kaninchen Nr. 178, durch subkutane Injektion immunisiert.

Lysin in 2 ccm	0,85 proz. Na Cl-Lösung in 2 ccm	Erythrocyten	
		gewaschen	ungewaschen
2	0	komplett	komplett
1	1	do.	do.
0,8	1,2	do.	do.
0,6	1,4	do.	do.
0,4	1,6	do.	fast komplett
0,2	1,8	do.	stark rot
0,1	1,9	do.	do.
0,08	1,92	do.	rosenrot
0,06	1,94	fast komplett	0

Die Wirksamkeit des Lysins auf Normalblut siehe Tabelle XVI.

Tabelle XVIII.
Kaninchen Nr. 182, durch intravenöse Injektion immunisiert.

Lysin in 2 ccm	0,85 proz. Na Cl-Lösung in 2 ccm	Erythrocyten	
		gewaschen	ungewaschen
2	0	komplett	komplett
1	1	do.	do.
0,8	1,2	do.	do.
0,6	1,4	do.	do.
0,4	1,6	do.	do.
0,2	1,8	do.	fast komplett
0,1	1,9	do.	stark rot
0,08	1,92	do.	schwach rot
0,06	1,94	fast komplett	rosenrot

Die Wirksamkeit des Lysins auf Normalblut ist in Tabelle XVI aufgezeichnet.

war Lc bei 0,08 (gewaschene Blutkörperchen) gelegen. Nur die gewaschenen Blutkörperchen konnten ja für diesen Versuch ausschlaggebend erscheinen, denn die nicht gewaschenen hatten ja naturgemäfs Immunserum anhaften. Diese schützende Wirkung kommt auch bei letzteren in der Tabelle gut zur Darstellung, nur ist es erstaunlich, eine wie grofse Wirkung hier so kleine Mengen von Serum, wie sie auf den entsprechenden Anteil eines Tropfens entfallen, auszuüben in der Lage sind. Bei

Kaninchen 178 geht der Wert von Lc = 0,08 auf 0,6 zurück, bei Kaninchen 182 von ebenfalls 0,08 auf 0,4. Auch Meinicke ([15]) weist in einer eben erschienenen Arbeit darauf hin, welch starke schützende Kraft die in einem Bluttropfen enthaltene Menge spezifischen Serums zu entfalten vermag.

Aus den vorstehenden Versuchen geht klar hervor, dafs die Erythrocyten von Kaninchen, deren Blut einen spezifischen Antikörper gegen das homologe Bakteriolysin besitzt, von diesem Bakteriolysin ebenso gelöst werden, wie normale Erythrocyten; die schützende Kraft haftet am Serum der Immuntiere. Aus dem Befunde, dafs wir intravenös immunisierten Kaninchen-Lysinmengen in die Blutbahn einspritzen können, ohne dafs eine Lösung erfolgt, trotzdem ja doch ein inniger Kontakt zwischen der injizierten Flüssigkeit und den roten Blutzellen des Tieres anzunehmen ist, schliefsen wir, dafs der Antikörper im Serum des Immuntieres eine gröfsere Avidität zum Lysin besitzen mufs, als für dieses die Erythrocyten besitzen, dafs der avide Antikörper also alles Lysin rasch an sich reifst und neutralisiert, so dafs die Erythrocyten nicht durch Bindung des Lysins geschädigt werden können.

Infektionsversuche.

I. Staphylococcus pyogenes aureus.

Kraus und Clairmont ([16]) fanden 1900, dafs es Stämme von Aureus gibt, welche kein Bakteriolysin erzeugen, neben solchen, denen Hämolysinbildung eigen ist.

Neisser und Wechsberg haben 1901 dann das Staphylotoxin in eingehender und genauer Weise studiert; ihre Technik ist von den meisten Autoren akzeptiert worden, und ihre Arbeit ist zurzeit so viel zitiert und so bekannt, dafs es überflüssig erscheint, auf dieselbe genauer einzugehen.

Bajardi ([17]) hat im selben Jahre das hämolytische Vermögen der Staphylokokken untersucht und berichtet, dafs Bouillonkulturen des Staph. aureus und albus auf die roten Blutkörperchen des Kaninchens (gewaschen und ungewaschen) hämo-

lytisch wirken. Bajardi behauptet auch den Zusammenhang zwischen hämolytischer und pyogener Eigenschaft.

Kraus und Ludwig haben Kaninchen subkutan Bouillonkulturen von Staphylococcus aureus injiziert, also gleichzeitig Hämolysin und lebende Bakterien einverleibt; sie konnten konstatieren, dafs eine bedeutende Abnahme der roten Blutzellen erfolgte. Die normale Zahl derselben war durch Kontrollen auf $5^1/_2$—$6^1/_2$ Millionen im Kubikzentimeter festgestellt worden, und nach der Injektion vorgenommene Zählungen zeigten, dafs Abnahmen von 1, 2, ja bis 4 Millionen stattgefunden hatten. Dafs wir heute schon ein Recht hätten, solche Abnahmen ganz allein durch die Hämolysinwirkung zu erklären — Kraus und Ludwig berühren diese Frage nicht — möchten wir sehr bezweifeln, denn es ist ja durchaus nicht ausgeschlossen, dafs nicht im Verlaufe der Infektion durch ein Darniederliegen der Blutbildung durch toxische nicht hämolytische Einflüsse ein Ersatz der durch das Lysin zerstörten Blutzellen hintangehalten werde. Wenn wir bedenken, dafs wir in unseren Versuchen bei der chronischen Staphylokokkeninfektion mit Ausgang in multiple Abszefsbildung Hämolyse niemals konstatieren konnten, während das Tier doch zugrunde geht, so gewinnt vielleicht unsere Anschauung an Berechtigung.

Die Arbeit von van Durme (18) ist im wesentlichen eine Nachprüfung und Bestätigung der Befunde von Neisser und Wechsberg. Er neigt der Ansicht zu, die heute nicht von allen Autoren geteilt wird, dafs ein enger Zusammenhang zwischen Pathogenität und hämolytischem Vermögen der Traubenkokken bestehe, gibt aber gleichzeitig zu, dafs die Akten über diese Frage noch nicht geschlossen sind.

Kutscher und Konrich (19) haben das Verhältnis studiert, in dem die Agglutinationsfähigkeit der Staphylokokken zur Hämolysinbildung steht und gefunden, dafs zwischen beiden gesetzmäfsige Beziehungen bestehen. Echte, eitererregende, durch ein spezifisches Serum agglutinable Staphylokokken bildeten ausnahmslos Hämolysin, eine Eigenschaft, welche sich nach der Ansicht der Verfasser bei saprophytischen Kokken nicht finde

und zur Differenzierung pathogener und nicht pathogener Kokken zu verwenden wäre.

Eine während der Abfassung des vorliegenden Berichtes von Fränkel und Baumann(20) publizierte Arbeit zeigt sich nicht in allen Punkten mit den Resultaten von Neisser und Wechsberg einverstanden. So berichten Fränkel und Baumann, dafs sie bei den meisten ihrer Kulturen die ersten Spuren der blutlösenden Fähigkeit schon nach eintägigem Aufenthalte im Brutschranke konstatieren konnten, während Neisser und Wechsberg erst nach 4 Tagen Hämolysinbildung beobachtet haben. Auch betonen Fränkel und Baumann, dafs sie den Höhepunkt der Lysinproduktion zwischen dem 6. und 10. gegenüber dem 10. und 14. Tage von Neisser und Wechsberg gefunden hätten.

Scheinen nun auch diese Unterschiede von untergeordneter Bedeutung, so müssen wir doch ein Moment in der Methodik hervorheben, das gewifs nicht gleichgültig sein kann.

Fränkel und Baumann arbeiteten mit nichtfiltrierten Bouillonkulturen, Neisser und Wechsberg haben Filtrate verwendet. Schon dieser Unterschied in der Technik schliefst einen Vergleich der Resultate aus. Einmal könnte ja bei der Verwendung von Bouillonkulturen die Wirkung der lebenden Bakterienleiber, über deren Einflufs auf die Blutkörperchen nicht viele Erfahrungen gesammelt sind, gewifs neben dem Einflusse der Stoffwechselprodukte in Betracht kommen, anderseits geben Fränkel und Baumann ja selbst an, dafs sie fanden, dafs durch den Filtrationsprozefs die hämolytische Kraft der Kulturen vermindert zu werden scheine, eine Erfahrung, die auch wir gemacht haben. Kann da nicht in den Versuchen von Fränkel und Baumann eine additive Wirkung von Stoffwechselprodukt und Bakterienleibern, und wenn es sich bezüglich letzterer auch nur um katalytische Beeinflussung handeln sollte, einen stärkeren hämolytischen Effekt erzielt haben gegenüber der durch die Filtration vielleicht verminderten hämolytischen Kraft der Kulturen von Neisser und Wechsberg?

Prinzipiell wichtiger ist eine andere Beobachtung, die Fränkel und Baumann gemacht haben. Sie betrifft die Thermostabilität des Staphylolysins. Neisser und Wechsberg erreichten eine Inaktivierung ihrer Kulturfiltrate durch 20 Minuten langes Erwärmen bei 56°. Fränkel und Baumann erzielten durch halbstündiges Erwärmthalten bei 60° nur eine Abnahme der hämolytischen Kraft; ja zwei Filtrate wurden durch Erhitzen auf 80 bzw. 100° nicht ihrer hämolytischen Fähigkeit beraubt. Diese Hitzebeständigkeit hat Analoga im Typhus-, Koli- und Pyocyaneus-Lysin.

Wir hatten zu wiederholten Malen Inaktivierungen von Staphylolysin verschiedener Stämme vorzunehmen, aber bei unseren Filtraten genügte stets ein halbstündiges Verweilen im Wasserbade von 65° C, um den gewünschten Zweck zu erreichen. Es scheinen sich auch hierin nicht alle Staphylokokkenstämme gleich zu verhalten, vielleicht auch beeinflufst die Kulturmethode die Eigenschaften des Lysins.

Untersuchungen über Hämolyse bei mit Staph. pyog. aureus infizierten Kaninchen.

Das Kaninchen stellt nach Neisser und Lipstein ([25]) das klassische Versuchstier für Staphylokokkeninjektionen dar und die klassische Applikation ist nach Ausspruch der beiden Autoren die intravenöse Einspritzung. Es ist ja ein jedem Bakteriologen bekannter Laboratoriumsversuch, die Injektion des Kaninchens durch intravenöse Einverleibung von Kartoffelbrei mit Staphylokokkenkultur vermischt vorzunehmen. Eine alte Erfahrung aber im Laboratorium ist es, dafs die Staphylokokken in fast allen ihren Eigenschaften eine grofse Unverläfslichkeit an den Tag legen. Die Stämme schwanken sehr in ihrer Virulenz, auch die Bildung von Hämolysin geht in vitro nicht immer Hand in Hand mit der Virulenz; so berichten uns Neisser und Wechsberg in einem Stamme, der bei erhaltener Virulenz die Fähigkeit der Hämolysinproduktion gänzlich verloren hatte.

Tödlich verlaufende Infektionen kann man sowohl durch intravenöse als auch durch intraperitoneale Einverleibung des

Infektionsmaterials erzielen, wobei es ziemlich gleichgültig sein dürfte, welchen Modus man wählt, wenn man nur bei der intraperitonealen Einverleibung grofse Mengen von Kultur einbringt, denn das Kaninchen gilt für die intraperitoneale Infektion verhältnismäfsig weniger empfänglich.

Jedenfalls war für unseren Versuchsplan zunächst die intravenöse Infektion als die günstigere Chancen bietende heranzuziehen, wenn wir auch später die intraperitoneale nicht aufser acht lassen wollten. Die Infektionen nahmen wir immer nur mit Agarkulturen vor. Die Einbringung von Bouillonkulturen schliefst ja auch das Einverleiben von Giftmengen in sich, ein Umstand, den wir lieber vermieden wissen wollten. Der chronische Krankheitsverlauf mit multiplen Abscedierungen, der so oft beobachteten Endo- und Pericarditis sollte ebenso für unsere Untersuchungen herangezogen werden, wie der durch hochvirulente Kultur bedingte innerhalb weniger Stunden mitunter schon tödlich verlaufende Prozefs.

Beide Typen des Verlaufes zeigen bezüglich der Hämolyse ein durchaus verschiedenes Verhalten. Bei dem chronischen Verlaufe (Tab. XIX) sehen wir intra vitam weder Hämolyse noch Nachhämolyse auftreten, ja auch bei der Sektion ist weder Hämolyse noch Nachhämolyse zu beobachten. Trotzdem Staphylokokken im Blute zirkulieren, üben dieselben hier keine hämolytische Wirkung aus. Gänzlich anders stehen die Dinge aber bei jenem Falle, wo der Tod rasch nach der Injektion erfolgte (Tab. XX). Da finden wir schon 1 Stunde nach der Einverleibung Hämolyse, hier Hämoglobinämie, ein Befund, der natürlich bei der sofort nach dem Tode (ca. 5 Std. nach der Injektion) vorgenommenen Sektion bestätigt wird.

(Siehe Tabelle XIX und XX auf S. 224.)

Besprechen wir nun die Resultate der intraperitonealen Infektionen (Tab. XXI und XXII), so sehen wir, dafs hier die Verhältnisse ganz eigentümlich sich gestalten. Das eine Tier (Nr. 90) reagiert auf die erste Infektion nur mit einer $\pm$ NH. Nach 7 Tagen wird ihm eine zweite Kultur (1 Agarröhrchen) einge-

Tabelle XIX.

Staphylococcus pyogenes aureus. Intravenöse Injektion. Kaninchen Nr. 86.

Datum		Hämolyse	Nachhämolyse	Bakteriologischer Blutbefund: mikroskopisch	Bakteriologischer Blutbefund: Agarstrich	
16. VI. 1903	Serumkontrolle	—	—			Schon am 17. VI. schwer krank. Am 19. VI. Nm. auf der Seite liegend, erholt sich dann. Am 20. VI. Früh auf der Seite liegend, agonal, lebt noch um 1h 30', wird um 2h tot, noch ganz warm, gefunden. Sektion 4h. Befund: Auf dem Herzbeutel Fibrinauflagerungen, derselbe mit dem Sternum schwartig verwachsen. In beiden Nieren Abszesse. Kultur. Herzblut: 56 Kol. Staph. aur. Leber: steril. Milz: 1 Kol. Staph. Harn: Staph. aureus rein. Keine Hämoglobinurie.
5h 50' p. m.	Agarkulturaufschw. intravenöse Ohrvene					
17. VI.	11h 45'	—	—	spärliche Diplokokken	11 Kol. Staph.	
	4h	—	—	0	44 Kol. Staph.	
18. VI.	11h 45'	—	—	0	1 Kol. Staph.	
	6h 30'	—	—	0	10 Kol. Staph.	
19. VI.	12h	—	—	zahlreiche Kokken	voll bewachsener Strich	
	6h	—	—	0	do.	
20. VI.	12h	—	—	wenige Kokken	steril	
Sektion	4h	—	—			

Tabelle XX.

Staphylococcus pyogenes aureus. Intravenöse Injektion. Kaninchen Nr. 206.

Datum		Hämolyse	Nachhämolyse	
21. V. 1904	Serumkontrolle	—	—	Tod um 3h 40'. Sektion sofort. Sektionsbefund: Starker Meteorismus. Wenig helles Serum im Perikard. Leber schlaff. Milz blutreich, prall, brüchig. Kultur: Herzblut, Leber, Milz } Staphylococcus pyogenes aureus.
um 11h Kulturaufschwemmung in die rechte Ohrvene				
	11h 05'		Ser. purpureum	
	12h 05'	+	Ser. purpureum	
Sektion	3h 40'	+	Ser. purpureum	

spritzt, das Tier geht innerhalb von 6 Stunden zugrunde, es zeigt weder intra vitam noch bei der Sektion eine auf vorausgegangene Blutkörperchenlösung hinweisende Veränderung des Serums. Wenn wir das Sektionsprotokoll genauer beachten, so wird uns aber auffallen, dafs eine alte Peritonitis (noch von der ersten Injektion verursacht) bestand und dafs wir in der Bauchwand Abszefsbildung konstatieren konnten. Wir haben es hier also offenbar auch mit einem chronischen Prozefs zu tun (vgl. Tab. XIX) und ebenso wie in dem Falle, auf welchen wir eben verwiesen haben, kam auch hier eine Hämolyse in keiner Form zur Beobachtung.

Anders im zweiten Falle (Tab. XXII). Dieses Tier erhielt am 16. Juni 1903 eine Aufschwemmung von Staphylokokken (Agarkultur) intraperitoneal, es reagierte kaum, ja sein Gewicht übertraf am 6. Tage nach der Infektion sein Anfangsgewicht. Am 7. Tage erhält das Tier zwei Agarröhrchen intraperitoneal injiziert. Es zeigt uns ± NH am Tage darauf, nimmt ab, erholt sich rasch und zeigt dann eine schwankende Gewichtskurve. Zirka 14 Tage nach der zweiten Infektion erhält das Tier vier Röhrchen Agarkultur intraperitoneal. Es zeigt zirka $3^1/_2$ Stunden später Hämoglobinämie, geht 4 Stunden nach der Infektion zugrunde, die Sektion zeigt das Andauern der Hämoglobinämie, aber keine Anhaltspunkte, dafs die beiden ersten Injektionen irgendwelche Läsionen im Gefolge gehabt hätten.

Wir haben also bei unseren Staphylokokkeninfektionen sowohl mit intravenöser wie auch mit intraperitonealer Infektion zweierlei durchaus verschiedene Resultate erhalten.

Einmal jene Fälle (Nr. 86 und 90), in denen der Verlauf der Krankheit ein langsamer war, wo es zur Ausbildung von Abszessen in den Nieren, zu entzündlichen Prozessen des Pericards, zu schwartigen Verwachsungen gekommen ist, wo — bei intraperitonealer Einverleibung — eine fibrinöse Peritonitis und Abscedierung der Bauchwand die Infektion bezeugen, bei denen aber Hämolyse in keiner Form konstatiert werden konnte. Die andere Gruppe ist jene (Nr. 88 und 206), wo die Tiere entweder der ersten (intravenösen) Infektion in kürzester Zeit erlagen, oder,

ohne auf eine wiederholte (intraperitoneale) Infektion reagiert zu haben, infolge einer gröſseren Dosis von Infektionsmaterial ebenfalls in kürzester Zeit starben. In beiden Fällen konstatieren wir Hämolyse als Hämoglobinämie und Nachhämolyse.

Wir sehen da Hämolyse zunächst in den Fällen auftreten, wo der Tod akutest eintritt (Nr. 88 und 206). Hier werden wir zur Erklärung des Auftretens der Hämolyse leicht mit der Auskunft uns zufrieden geben, es seien die Kulturen hochvirulent gewesen und dementsprechend eine tödliche und nach der Ansicht vieler Autoren auch entsprechend stark hämolysierende Wirkung erfolgt. Letztere kann man sich vorstellen, als durch direkte Einwirkung der Bakterienleiber auf die roten Blutzellen bedingt, insbesondere in jenen Fällen, wo ja durch intravenöse Injektion die Staphylokokken direkt in die Blutbahn gelangen (Nr. 206), für die intraperitoneale Einverleibung könnte auch noch der Auffassung Rechnung getragen werden, daſs etwa durch die Peritonealflüssigkeit Giftsubstanzen der Staphylokokken ausgelaugt und im Wege des Kreislaufes rasch an die Erythrocyten gebracht würden.

Wie stehen wir aber Nr. 90 Tabelle XXI gegenüber?

Hier ist ebenfalls auf die intraperitoneale Einverleibung des Bakterienmaterials hin in kurzer Zeit, innerhalb von 6 Stunden der Tod erfolgt, aber wir konnten weder Hämolyse noch Nachhämolyse weder intra vitam noch bei der Sektion konstatieren. Wohl aber fand sich, wie schon oben bemerkt, eine Peritonitis älteren Datums und Abszeſsbildung. Wir sind da vielleicht mit unserer erneuten Injektion der Entwicklung eines kachektischen Stadiums, das auch mit dem Tode geendet hätte, zuvorgekommen, indem wir durch Einführung frischen, nicht als Hämolysin sondern als Endotoxin zu charakterisierenden Giftes den Prozeſs zum raschen letalen Ende brachten. Aber die Hämolyse blieb hier aus, und für diese Erscheinung möchten wir uns bemühen, eine Erklärung zu finden.

Es erscheint uns nicht unmöglich, daſs infolge der früheren Injektion eine gewisse einseitige, nur das hämolytische Vermögen der dann frisch eingebrachten Kulturmengen paralysierende Immunität erreicht worden sei. Die Annahme dieser Möglichkeit

scheint uns wohl etwas gezwungen zu sein, insbesondere wenn wir uns erinnern, dafs durch intraperitoneale Einverleibung von Staphylolysin Neisser und Wechsberg eine Antikörperbildung beim Kaninchen nicht gelungen ist. Auch wenn wir Tabelle XXII Nr. 88 in Betracht ziehen, steigen uns Bedenken auf. Hier ist ja das Tier nach zwei erfolglosen Injektionen der dritten binnen wenigen Stunden unter der Erscheinung von Hämoglobinämie erlegen, ohne dafs die vorangehenden Infektionen eine Immunität gegen Hämolyse erzeugt hätten. Aber da müssen wir doch in Rechnung bringen, dafs die Immunitätslehre bei Staphylokokkeninfektionen ein noch zu wenig bekanntes Gebiet darstellt, um aus einigen nach anderer Richtung hin angestellten Versuchen daraus Schlüsse für oder wider ziehen zu können.

Tabelle XXI.

Staphylococcus pyogenes aureus. Intraperitoneale Injektion. Kaninchen Nr. 90.

Datum		Hämolyse	Nachhämolyse	Bakteriologischer Befund	
				mikroskopisch	Agarstrich
16. VI. 1903	Serumkontrolle	—	—		
6h p. m. Aufschwemmung von Agarkultur intraperitoneal					
17. VI.	12h 05′	—	± ?	0	steril
18. VI.	12h 30′	—	—	0	steril
19. VI.	6h 45′	—	—	0	Staph. aur.
23. VI.	12h	—	—		
um 12h 05′ 1 Röhrch. Agarkulturaufschwemmung intraperitoneal					
	4h 42′	—	—		
Sektion	5h 54′	—	—		

Am 17. VI. sehr krank. 18. VI. Zustand besser.
Am 20. VI. so munter, dafs von weiteren Entnahmen abgesehen wird.
Am 23. um 4h agonal. Tod innerhalb 6 Std. um 5h 54′. Sektion sofort.
Befund: Fibrinöse Peritonitis, Abszefsbildung in der Bauchwand. Im Abdomen ca. 3 ccm trübe Flüssigkeit.
Kultur: Leber, Bauchwandabszefs } Staph. aur. Herzblut: steril.

Tabelle XXII.

Staphylococcus pyogenes aureus. Intraperitoneale Injektion. Kaninchen Nr. 88.

Datum		Hämolyse	Nachhämolyse	Bakteriologischer Blutbefund: Mikroskopisch	Bakteriologischer Blutbefund: Agarstrich	
16. VI 03	Serumkontrolle	—	—			Auf die erste Injektion hin nicht sehr krank gewesen, war schon am 19. VI. wieder sehr munter. Auf die zweite Injektion am 23. VI. ebenfalls keine Reaktion. Das Tier erliegt der dritten Injektion mit grofsen Mengen von Kultur innerhalb 5 Stunden um 5h 07'. Sektion sofort. Befund: In der Bauchhöhle 10 ccm blutig seröse Flüssigkeit (Darmverletzung ausgeschlossen). Im Pleuraraum 5 ccm ebensolches Serum. Kultur: Bauchexsudat, Brustexsudat, Herzblut, Leber, Milz } Staph. pyog. aureus.
5h 55' Aufschwemmung von Agarkultur intraperitoneal						
17. VI.	12h	—	—	0	steril	
18. VI.	12h	—	—	0	steril	
19. VI.	12h 15'	—	—	0	Staph. aureus	
20. VI.	12h 15'	—	—	0	steril	
23. VI.	12h					
2 Röhrchen 24h Agarkultur in ster. dest. Wasser intraperitoneal						
24. VI.	11h 45'	—	± ?			
25. VI.	12h	—	—			
26. VI.	12h 45'	—	—			
7. VII.	1h	—	—			
um 1h 20' 4 Röhrch. Agarkulturaufschwemmung intraperitoneal						
	4h 45'	+	Ser. purpureum			
Sektion	5h 07'	+	Ser. purpureum			

Für die Staphylokokkeninjektionen des Kaninchens hätten wir demnach hinsichtlich der Hämolyse den Grundsatz aufzustellen: Die chronische Staphylomykose mit Ausgang in multiple Abscedierung läfst uns während ihres ganzen Verlaufes und nach erfolgtem Tode eine Hämolyse in irgend einer Form nicht erkennen; die Anwesenheit von Bakterien im strömenden Blute hatte hiebei keinen hämolytischen Effekt zu bedingen vermocht.

Bei akutem Verlauf der Infektion ist jedoch Hämolyse als Hämoglobinämie und Nachhämolyse zu beobachten, gleichgültig ob die Einverleibung des Bakterienmaterials intravenös oder intraperitoneal erfolgt.

II. Streptokokken.

Gelegentlich der zahlreichen Untersuchungen, die man über das Gift der Kettenkokken angestellt hat, wurde man auch darauf aufmerksam, dafs dieselben unter Umständen blutlösende Eigenschaften besäfsen.

Der erste, der einen solchen Befund verzeichnet, ist wohl Bordet (21), der im Jahre 1897 darauf hinweist, dafs man bei der Sektion von Kaninchen, die Streptokokkeninfektionen erlegen waren, Serum finde, welches durch Hämoglobin rot gefärbt sei. Da wir uns im folgenden mit diesem Befunde Bordets zu beschäftigen haben werden, seien seine eigenen Worte hier wiedergegeben. Er sagt: »Au moment de la mort l'examen du sang trahit des altérations manifestes des globules rouges. Ceux-ci sont presque entièrement disparu. Le coeur d'un lapin autopsié immédiatement après la mort contient un caillot, assez volumineux, rouge clair, imbibé d'un sérum où l'hémoglobine s'est largement diffusée.«

v. Lingelsheim (22) hat die Blutveränderungen bei Streptokokkeninfektionen genau studiert. Er konstatierte als sehr häufigen Befund bei Obduktionen von Tieren, die an solchen Infektionen zugrunde gegangen waren, eine lackfarbene Beschaffenheit der Blutflüssigkeit. v. Lingelsheim impfte dann mit dem

Blute solcher Tiere Röhrchen, die mit Blut derselben Tierart beschickt waren, und konnte beobachten, dafs oft schon nach 3—4 Stunden Aufenthaltes im Thermostaten das Plasma anfing sich rot zu färben, Hämoglobin also aus den roten Blutzellen ausgetreten sein mufste. v. Lingelsheim versuchte nun festzustellen, ob sich diese hämolytischen Veränderungen schon intra vitam zeigen, und ob diesem Nachweise eine besondere Bedeutung für den Krankheitsprozefs überhaupt beigemessen werden könne. Von der Ansicht ausgehend, dafs die Anwesenheit von zahlreichen Streptokokken im Blute Hand in Hand gehen werde mit der Äufserung der blutlösenden Eigenschaft, versprach sich v. Lingelsheim nicht viel für die Beurteilung des Krankheitsbildes, da ja erfahrungsgemäfs die Überschwemmung des Blutes mit Streptokokken erst spät, nach v. Lingelsheim in den allerletzten Lebensstunden, einzutreten pflegt. v. Lingelsheim bediente sich der Methode, das Blut der zu untersuchenden Tiere in eine Lösung von zitronensaurem Natron (4 Teile Blut auf 1 Teil 5proz. zitronensaures Natron und Kochsalz ana) einfliefsen zu lassen. Das auf diese Weise vor dem Gerinnen geschützte Blut wurde dann zentrifugiert. Bei dieser Methode fand v. Lingelsheim erst etwa eine Stunde vor dem Tode auf Hämolyse deutende Veränderungen, indem das Plasma rosenrot erschien. Mikroskopisch waren zu dieser Zeit zahlreiche Streptokokken im Blute nachweisbar. v. Lingelsheim mifst nun aus dem Grunde, weil ja die hämolytischen Veränderungen beim Streptokokkenkaninchen erst zu einer Zeit aufzutreten pflegen, wo das Schicksal des Tieres ohnehin »als besiegelt angesehen werden kann«, denselben für das Kaninchen keine Bedeutung bei. Beim Menschen aber sieht er in der blutschädigenden Wirkung, die gelegentlich einer Streptokokkeninfektion die Mikroorganismen ausüben können, »einen der Gründe für die schweren Anämien, die im Anschlufs an septische Erkrankungen vielfach beobachtet werden.«

v. Lingelsheim gibt seiner Vermutung Ausdruck, dafs es sich bei der blutlösenden Wirkung der Streptokokken um den Einflufs von Stoffen handle, die Absonderungsprodukte sind. Da es ihm nicht gelang, in den Filtraten von Streptokokkenkulturen

hämolytisch wirkende Stoffe nachzuweisen, auch der Zusatz abgetöteter Streptokokken zu Blut vergeblich war, hält v. Lingelsheim zum Zustandekommen der Hämolyse die Anwesenheit der lebenden Bakterien für unbedingtes Erfordernis.

Nach einigen vergeblichen Versuchen ist es Besredka (23) gelungen, ein wirksames Filtrat von Streptokokkenkulturen zu erlangen. Besredka züchtete seine Streptokokken in inaktiviertem Kaninchenserum und filtrierte nach Verdünnung mit einer 0,75proz. NaCl-Lösung durch Chamberlandfilter. Auch Schafserum, zu einem Viertel mit Hasenserum versetzt, erwies sich als eine gute Hämolysinproduktion gestattende Kulturflüssigkeit.

Wir möchten hier darauf aufmerksam machen, dafs Schlesinger (24) in seinen »Untersuchungen über das Hämolysin der Streptokokken« sagt, »Besredka fand im Gegensatz zu Aronson in den Filtraten von Streptokokkenkulturen nie Hämolysin. Er sah dies als Beweis an, dafs das Hämolysin in den Bakterien selbst enthalten sei.«

Allerdings sagt Besredka (Annales de l'Institut Pasteur Tome XV, 1901, pag. 881 et 882), den negativ ausgefallenen Versuch, durch Züchtung in Ascitesbouillon nach Marmorek wirksame Filtrate zu erhalten, besprechend: »nous avons préparé une culture en bouillon-ascite et 24 heures après quand elle a été déjà très abondante nous l'avons séparée des microbes à la bougie Chamberland dans l'espoir de découvrir dans le filtrat l'hémolysine. Or ce filtrat essayé vis-à-vis de diffèrentes espèces de globules rouges se montra aussi peu hémolytique que l'est le bouillon-ascite avant qu'il soit ensemencé.« Dem aufmerksamen Leser der Besredkaschen Arbeit wird aber kaum entgehen können, dafs nur wenige Zeilen unter obigen der Einleitung angehörenden Worten zu lesen ist: »Sans nous décourager de ce résultat négatif nous avons cherché à varier les milieux de culture; après de nombreux tâtonnements dont il sérait inutile d'entretenir le lecteur nous avons réussi à obtenir une solution d'hémolysine streptococcique, qui par l'intensité de son action ne cède presque en rien à celle de la culture entière de streptocoque vivant et virulent.«

Natürlich mufs auch gegen den zweiten Satz von Schlesinger protestiert werden. Denn ganz im Gegenteil hierzu hat ja Besredka in seinen Schlufsfolgerungen noch ausdrücklich hervorgehoben: »Dans certaines conditions bien déterminées, le streptocoque sécrète une substance de nature probablement diastasique, qui possède des propriétés hémolytiques très prononcées.« Wir mufsten wohl auf Schlesingers Bemerkung eingehen, um das Weiterschleppen einer falschen Angabe in der Literatur, wenn möglich, zu verhindern.

Lubenau ([26]) teilt uns mit, dafs er durch Kultivieren von Streptokokken in einer »2% Pepton enthaltenden Extraktbouillon« wirksames Hämolysin nachweisen konnte. Es ist seiner Arbeit aus dem Zusammenhange zu entnehmen, dafs es sich um Filtrate gehandelt hat.

Aronson ([27]) ist es nicht gelungen, mit Filtraten von Streptokokkenbouillonkulturen Hämolyse zu erzielen, während die Kulturen vor dem Filtrieren hämolytische Kraft besessen hatten. Meyer ([28]) bestätigt die Brauchbarkeit der Methode von Besredka, mit welcher er gute Resultate erhalten hat.

Schlesinger (l. c.) beobachtete in Streptokokkenbouillonkulturen Blutlösung. Eine Arbeit von Breton ([29]) steht uns leider nur im Referat zur Verfügung. Breton soll in mit Streptokokken injizierten Tieren schon 10 Stunden nach der Infektion eine Andeutung von Hämolyse konstatiert haben. Dieser Erfahrung, welche weder den Befunden von v. Lingelsheim noch den unsrigen zu entsprechen scheint, nachzugehen, ist uns leider mangels der einschlägigen französischen Literatur derzeit unmöglich gewesen.

Simon ([30]) hat eingehende Untersuchungen über die Gifte der Streptokokken angestellt und ist bezüglich toxischer und hämolytischer Wirkungen der Streptokokken zu höchst interessanten Resultaten gelangt. Obwohl die Besprechung seiner Versuche über die toxinbildende Fähigkeit der Kettenkokken eigentlich nicht zu unserem Thema gehört, so können wir doch nicht umhin, uns mit denselben zu befassen, da Simon Befunde erhoben hat, die seiner Ansicht nach dafür sprechen, dafs

zwischen Toxinbildung und Lysinbildung bei Streptokokken eine gewisse Relation — allerdings in negativem Sinne — bestünde.

Der genannte Forscher hat zunächst, um zu erfahren, ob im Körper der mit Streptokokken infizierten Tiere ein gelöstes Toxin sich nachweisen lasse, Kaninchen vor der Infektion Aleuronataufschwemmungen in die Pleurahöhle injiziert, dann nach Verlauf von 6—24 Stunden eine tödliche Dosus virulenter Streptokokken nachgespritzt. Nach eingetretenem Tode wurde das Exsudat gewonnen, filtriert und gesunden Kaninchen einverleibt. Der Erfolg war verschieden; manche Tiere starben, andere erkrankten unter Gewichtsacnahme und zwei Versuche fielen negativ aus.

Diese Erfahrungen bewogen Simon, zu untersuchen, ob sich nicht die Exsudate als Kulturboden für den Streptokokkus eignen würden, ob es also gelingen würde, auf diesem Wege im Reagensglas wirksame Toxine darzustellen. Die Kultivierung wurde im Buchnerröhrchen vorgenommen, entsprechend einer Empfehlung von Manfredi und Traversa und im Sinne von Roger. Diese Methode erwies sich als brauchbar, es gelang Simon, mit den Kulturfiltraten Kaninchen zu töten. Die Sektionen dieser Tiere liefsen stets eine lackfarbene Beschaffenheit des Blutes vermissen, ebensowenig konnten blutig gefärbte Ergüsse im Pleuraserum oder Perikad konstatiert werden, während Simon bei an Streptokokkeninfektionen zugrunde gegangenen Tieren allerdings nicht immer, so doch meist blutige Exsudate in Pleuraraum und Perikard gefunden hatte.

Simon bemerkt nun bei dieser Gelegenheit, dafs er die »Hämolyse in vivo, welche nach Marmorek ([48]) für die Staphylokokkeninjektion pathognonomisch sein soll« bei den Tieren, welche mit lebenden Kulturen seiner drei virulenten Streptokokkenstämme getötet wurden, nur in einer sehr kleinen Minderzahl der Fälle gesehen habe. Über die bei den letztgenannten Versuchen angewendete Untersuchungsmethode, die ja, wie wir im folgenden sehen werden, äufserst wichtig ist, fehlen entsprechende Angaben, infolgedessen müssen wir uns hier kritischer Bemerkungen enthalten.

Die mit den Filtraten, welche erwiesenermafsen ein Kaninchen schädigendes Toxin enthalten hatten, angestellten Hämolyseversuche im Reagensglase fielen negativ aus. Da Simon die Schuld an diesem Ausfall einem zu geringen hämolytischen Vermögen seiner Streptokokkenstämme beimafs, suchte er durch Tierpassagen dasselbe zu steigern. Ein Stamm wurde nacheinander durch vier Tiere geschickt, indem jedes Tier direkt mit dem Herzblute seines Vorgängers geimpft wurde, ohne dafs Kulturen auf künstlichem Nährboden eingeschaltet worden waren. Tier 2, 3 und 4 zeigten bei der Sektion lackfarbenes Blut. Das fünfte Tier wurde mit einer Bouillonkultur geimpft, welche aus dem Herzblut von Tier 4 gewonnen worden war. Simon bemerkt, dafs »bei dessen Autopsie von einer Hämolyse in vivo nichts zu sehen« war.

Nach Ansicht von Simon habe die einmalige Anwendung der künstlichen Kultur die hämolytische Eigenschaft der Streptokokken verschwinden lassen, während die erhaltene Virulenz durch den Tod des Tieres zur Genüge bewiesen ist. Simon will daher die Äufserung von Marmorek eingeschränkt haben und wünscht, dieselbe solle lauten: Die Hämolyse in vivo wird bei Tieren beobachtet, welche der Infektion mit dem Blut eines Streptokokken-Tieres erliegen.

Wir kommen weiter unten auf diese Frage ausführlich zurück.

Bei den Untersuchungen Simons zeigte sich nun bezüglich der toxischen und hämolytischen Wirkung zweier Filtrate, die aus Exsudatbouillonkulturen gewonnen worden waren, eine eigentümliche Divergenz der Wirkungen. Beide Exsudatbouillonkulturen waren mit dem gleichen Streptokokkus angelegt worden. Das eine Filtrat erwies sich hämolytisch wirksam aber wenig giftig, das andere ergab ein tödlich wirkendes Filtrat, aber die hämolytische Eigenschaft fehlte gänzlich. Die Kulturen waren ungefähr gleich alt gewesen, zeigten aber eine erhebliche Differenz bezüglich ihres Wachstums. Simon konnte beobachten, dafs diejenigen Filtrate den gröfsten Toxingehalt ergeben hatten, welche aus Kulturen stammten, welche eine sichtbare Wachstumshemmung durch, wie Simon meint, die bakteriziden Stoffe

des als Nährboden verwendeten Pleuraexsudates erlitten hatten, und er konnte zeigen, dafs das toxische Vermögen seiner Filtrate abnahm, ja gänzlich verschwand, wenn die Kultur zur üppigen Entwicklung gelangte. Nach Simon also produzieren die Streptokokken nur dann Toxine, wenn sie durch die bakteriziden Säfte des Tierkörpers bis zu einem gewissen Grade in ihrem Wachstum beeinträchtigt werden. Simon ist auch, jedoch mit berechtigter Reserve, da er über zu wenig Versuche verfügt, der Ansicht, dafs andererseits, nachdem in jenen Kulturen, welche offenbar infolge einer geringen bakteriziden Energie den Streptokokken gutes Wachstum gestatteten, reichliche Hämolysinbildung zu beobachten war, Streptokokken nur dort Hämolysin erzeugen, wo sie keinen grofsen antibakteriellen Widerständen ausgesetzt sind. Mit Recht beruft er sich hierbei auf die Erfolge der Methode von Besredka, der zur Hämolysingewinnung Kulturen in inaktiviertem Kaninchenserum verwendete. Nach Simon also sind die Bedingungen, unter denen Toxin und Hämolysin der Streptokokken gebildet werden, gänzlich entgegengesetzte.

In neuester Zeit hat Kerner (31) über die Hämolyse der Streptokokken Untersuchungen angestellt. Er konnte konstatieren, dafs Bouillonkulturen hämolytisch wirkten; Filtrate von solchen zeigten keine hämolytische Wirkung, jedoch erwiesen sich Filtrate aus Kulturen in flüssigem Blutserum als blutlösend; auch hier war eine durch den Filtrationsprozefs bedingte Abnahme der hämolytischen Wirkung zu bemerken.

Untersuchungen über Hämolyse bei mit Streptokokken infizierten Kaninchen.

Wir heben aus 14 Versuchen, die uns über die Hämolyse bei infizierten Kaninchen orientiert haben, vier Versuche heraus. Vor allem wäre aber zu bemerken, dafs von einer »Hämolyse in vivo« bei der Streptokokkeninjektion insofern nicht die Rede sein kann, als man die Beurteilung der sofort nach der Entnahme zentrifugierten Probe in Betracht zieht. Aber auch diejenigen Proben, welche unmittelbar nach dem Tode entnommen und sofort untersucht worden waren, liefsen eine Hämolyse

(Hämoglobinämie) in keinem Falle erkennen. Zieht man jedoch die Konstatierung der Nachhämolyse als verfeinerten Nachweis heran, so sehen wir in allen Versuchen eine erfolgte Schädigung der Erythrocyten deutlich ausgesprochen.

Die Frage nach der »Hämolyse in vivo« oder der bei sofortiger Sektion (Bordet) gesehenen Blutlösung ist nicht ohne Interesse, schon deshalb, weil wir, wie oben bereits angeführt, Marmorek behauptet, erstere sei für die Streptokokkeninfektion charakteristisch. Er sagt: »Seit Beginn unserer Versuche über die Virulenzsteigerung des Streptokokkus haben wir konstatiert, daſs das Blut von Kaninchen, welche uns zur Tierpassage dienen, sich noch im Körper löst und eine klare durchsichtige Burgunderfarbe annimmt. Diese Eigenschaft, die roten Blutkörperchen in den Gefäſsen selbst aufzulösen, ist nicht bloſs eine Fähigkeit, welche den Streptokokken allein zukommt, sondern — und dies steigert ganz besonders den Wert dieses unterscheidenden Merkmales — sie wächst im geraden Verhältnis mit der Virulenz. Je virulenter ein Streptokokkus ist, um so rascher und besser löst er das Blut im Körper seines Wirtes.«

Wir haben da in erster Linie zu konstatieren, daſs vor unseren Untersuchungen die Methode auch die Nachhämolyse zur Beurteilung des Verhaltens des Blutes infizierter Tiere zu verwenden wohl nicht eingeführt gewesen ist, und daſs nur mit Hilfe dieser Methodik auf eine eventuelle Schädigung »in vivo« geschlossen werden kann, alle aber bei Streptokokkeninjektionen dem lebenden Tiere oder dem eben verendeten sofort entnommenen und untersuchten Proben ergaben uns ausnahmslos das Fehlen einer Hämolyse. Das Verstreichenlassen aber einer relativ geringen Zeit zwischen Tod und Zentrifugieren der sofort nach dem Tode entnommenen Proben genügte, um wesentlich andere Resultate sehen zu lassen. Das 12 Minuten vor dem Tode entnommene Blut zeigte bei Kaninchen Nr. 81 Tabelle XXVI farbloses Serum, das Serum des Sektionsblutes war gleichfalls ohne Färbung, eine 3 Stunden später untersuchte Blutprobe zeigte bereits purpurrotes Serum! Ja in einem zweiten Falle, wo wir die Sektion nur wenig mehr als 30 Minuten nach dem

Exitus vornahmen, zeigte das Serum bereits einen starken Stich ins Rötliche.

Dies wäre also als Nachhämolyse, nicht als Hämolyse »in vivo« als Hämoglobinämie zu deuten. Diese konnten wir niemals bei der Streptokokkeninfektion beobachten, eine Schädigung der roten Blutzellen im Verlaufe der Infektion ist jedoch sicher und als NH in unseren Protokollen ausgewiesen.

Nicht nur der Angabe Marmoreks bezüglich der Hämolyse in vivo begegnen unsere Zweifel, auch bezüglich des Zusammenhanges, den er zwischen Virulenz und Hämolyse konstruiert hat, haben wir schwere Bedenken. Wie stimmt denn diese Wechselbeziehung mit dem Versuche Simons (l. c.), der in fünfter Passage durch das Kaninchen von einer Hämolyse »in vivo« bei der Sektion nichts bemerken konnte und wie stimmen seine Angaben zu unseren Versuchsprotokollen?

Bezüglich der Hämolyse als Obduktionsbefund haben wir genau zu unterscheiden, ob die Sektion unmittelbar nach erfolgtem Tode vorgenommen wird oder nicht. In ersterem Falle finden wir das Serum ungefärbt, in letzterem ausnahmslos eine deutliche, jedoch je nach der verstrichenen Zeit mehr oder minder intensive Blutlösung eingetreten.

Tabelle XXIII.

Verhalten des Blutes von Streptokokken-Kaninchen je nach der Zeit der Sektion.

Nr.	Sektion nach dem Tode	Hämolyse
77	Sofort	—
79	»	—
80	»	—
81	»	—
16	30—40 Minuten	+
78	1 $^1/_2$ Stunden	+
44	5 Stunden	+
22	7 Stunden	+

Auf diese Blutlösung als Sektionsbefund hat ja, wie schon oben erwähnt, seinerzeit Bordet aufmerksam gemacht, nur befremdet uns die zitierte Bemerkung des französischen Forschers

»autopsié immédiatement«, da wir, wie gesagt, in allen unseren Fällen, wo wir den Eintritt des Todes ad hoc abgewartet und die Sektion sofort vorgenommen hatten, niemals eine Hämolyse (Hämoglobinämie) konstatieren konnten. Vielleicht dürfen wir das »immédiatement« nicht ganz wörtlich nehmen und soll damit nur gemeint sein, dafs die Sektion sehr bald nach dem Tode vorgenommen wurde. Dafür spricht auch der Umstand, dafs Bordet selbst sagt »le coeur . . . contient un caillot assez volumineux.« Wir haben unmittelbar nach dem Tode das Blut stets flüssig gefunden.

Dafs eine Verzögerung von 30—40 Minuten schon genügt, um eine Nachhämolyse beobachten zu können, haben wir ja oben gezeigt, und dafs es nötig ist, einen so scharfen Unterschied zwischen Hämoglobinämie und Nachhämolyse zu machen, ist ja erst ein Resultat der vorliegenden Untersuchungen. Auch auf die Arbeit von v. Lingelsheim wäre noch einmal zurückzukommen. v. Lingelsheim hat ja angegeben, dafs das in den letzten Lebensstunden der Streptokokkentiere in 5 proz. Lösung von zitronensaurem Natron und Kochsalz ana aufgefangene Blut Hämolyse gezeigt habe.

Gegen diese Befunde läfst sich vor allem einwenden, dafs die Flüssigkeit, in der sich die ja zweifellos schon geschädigten roten Blutzellen befanden, den Bedingungen der Jsotonie nicht entsprach.

Es wurden 4 Teile Blut mit 1 Teil der Mischung versetzt, was eine Kochsalzkonzentration von 1% plus einer solchen von 1% zitronensaurem Natron entspricht. Nun ist ja bekanntlich die isotonische Kochsalzlösung für Kaninchenblut 0,85% und wir wissen, dafs geschädigte Erythrocyten auch nur geringe Schwankungen des isotonischen Gleichgewichtes mit Hämoglobinaustritt beantworten; es summiert sich hier zudem noch die hyperisotonische Kochsalzkonzentration mit der Konzentration des zitronensauren Natrons. Es dürfte also unserer Meinung nach die Erklärung für die intra vitam beobachtete Lösung der roten Blutzellen in den Versuchen von v. Lingelsheim lediglich in der ungeeigneten Untersuchungsmethodik zu suchen sein.

Wenn wir die in den folgenden Tabellen niedergelegten Resultate betrachten, so können wir in dreien der Versuche parallel gehend mit dem positiven bakteriologischen Nachweise der Bakterien eine Schädigung des Blutes, Nachhämolyse, beobachten. Es könnte uns diese Konstatierung zu dem Schlusse verleiten, dafs die Hämolyse unbedingt abhängig sei von dem Auftreten der Bakterien im Blute. Dafs dies nicht zutreffen mufs, zeigt uns Tabelle XXV Kaninchen Nr. 80. Hier konnten wir am Tage nach der Infektion Bakterien im Blute mikroskopisch nachweisen, letzteres wohl ein Zeichen, dafs sie in grofser Anzahl kreisen mochten, aber eine Nachhämolyse ist zu dieser Zeit nicht zu konstatieren. Noch am zweiten Tage nach der Infektion kreisen Streptokokken, wie der kulturelle Nachweis ergibt; auch diesmal finden wir weder Hämoglobinämie noch Nachhämolyse. Ungefähr 9 Stunden später bleibt die Kultur steril und die Untersuchung auf Hämolyse wie Nachhämolyse fällt negativ aus. Vier Stunden vor dem Tode ist die Zahl der Bakterien im Blute noch eine keineswegs sehr grofse, denn der mikroskopische Nachweis ist nicht gelungen, die Kultur hingegen positiv; gleichzeitig tritt Nachhämolyse in Erscheinung. Die sofort nach dem Tode vorgenommene Sektion zeigt keine Hämoglobinämie, jedoch Nachhämolyse.

Diese Befunde bestätigen durchaus die Ansicht von v. Lingelsheim, dafs die Hämolyse erst eine Erscheinung der letzten Lebensstunden des ohnedies dem Tode geweihten Tieres sei, aber sie scheinen uns auch die Möglichkeit zu bieten, die betreffs der Reagensglasversuche geäufserte Ansicht von Simon, dafs die Streptokokken nur dann imstande seien, ein Hämolysin zu bilden, wenn sie gute Wachstumsbedingungen finden, auf den Tierversuch zu übertragen. Die bakteriziden Kräfte des Tieres kämpften gegen die Streptokokkeninvasion, die produzierten Toxine der Bakterien neutralisieren gleichsam nach und nach die Widerstandsfähigkeit und siegen im Kampfe. Jetzt kann eine Vermehrung der Streptokokken ungehindert erfolgen, und da die Säfte des Tierkörpers nun einen guten Nährboden für die Bakterien darstellen, sind im Sinne von Simon

günstige Bedingungen für die Lysinproduktion geschaffen. Zur Zeit, als wir in Tabelle XXV bei Kaninchen 80 Streptokokken im Blute nachwiesen, ohne dafs es zur Nachhämolyse kam, könnte vielleicht das Blut noch widerstandsfähig genug gewesen sein, es bot noch keinen guten Nährboden dar. In der Tat verschwinden auch die Streptokokken wieder aus der Blutbahn. Die Toxine belagern und schwächen den Organismus weiter, seine Bakterizidie ist vielleicht überwunden, nun treten die Streptokokken neuerdings im Blute auf und diesmal kommt es — wenige Stunden vor dem Tode — zur Schädigung der Erythrocyten.

In Tabelle XXVI bei Kaninchen Nr. 81 haben wir durch Verwendung gröfserer Mengen von Bouillonkultur gleichzeitig gröfsere Mengen von Toxin mit einverleibt und so vielleicht den Verlauf des ganzen Prozesses beschleunigt.

Dafs aber bei Einverleibung von Agarkultur — abgesehen von der Verlaufsdauer — ein Unterschied hinsichtlich der Hämolyse gegenüber den Injektionen mit Bouillonkulturen nicht zu bemerken ist, zeigt Nr. 82 in Tabelle XXVII. Hier verläuft die Injektion langsamer, weil sich die Bakterien wohl erst ihren Boden durch Toxinbildung im Körper erkämpfen müssen, während ihnen im vorigen Falle die Einbringung schon präformierten Toxines die Arbeit erleichtert hatte.

Tabelle XXIV.

Streptococcus pyogenes. Kaninchen 77. Intraperitoneale Injektion von 2 ccm Bouillonkultur. Tod nach 46 Stunden.

Datum	Zeit der Entnahme	Hämolyse	Nachhämolyse	Bakteriologischer Befund		
				mikroskopisch	Agarstrich	
25. V. 1903	Kontrolle	—	—			Exitus am 27. V. um 4h 35'. Sektion sofort.
6h 30' p.m.	Infektion					
	7h	—	—			Befund: Mikroskopisch in Herzblut und Milz vereinzelte, in der Leber zahlreiche Diplokokken. Kultur aus Herzblut, Leber und Milz Streptokokken.
	7h 30'	—	—			
26. V.	10h	—	—			
	11h	—	—			
	4h 30'	—	—			
27. V.	11h 15'	—	+	0	Streptokokken	
	Sektion	—	+	+	—	

Tabelle XXV.

Streptococcus pyogenes. Kaninchen 80. Intraperitoneale Injektion von 2 ccm Bouillonkultur. Tod nach ca. 4 Tagen.

Datum	Zeit der Entnahme	Hämolyse	Nachhämolyse	Bakteriologischer Befund		
				mikroskopisch	Agarstrich	
27.V.1903	Kontrolle	—	—			Exitus am 31.V. um 3h 28' Sektion sofort. Mikroskopisch in Herzblut, Milz und Leber spärliche Kokken, in der Kultur aus Herzblut, Milz u. Leber Streptokokken.
6h p. m.	Infektion					
28. V.	12h 30'	—	—	Diplokokken	Kultur nicht angelegt	
29. V.	10h 40'	—	—	0	Streptokokken	
	8h p. m.	—	—	0	steril	
30. V.						
31. V.	11h 30'	—	+	0	Streptokokken	
	Sektion	—	+	+	+	

Tabelle XXVI.

Streptococcus pyogenes. Kaninchen Nr. 81. Intraperitoneale Injektion von 20 ccm Bouillonkultur. Tod nach 25 Stunden.

Datum	Zeit der Entnahme	Hämolyse	Nachhämolyse	Bakteriologischer Befund		
				mikroskopisch	Agarstrich	
27. V. 03	Kontrolle	—	—			Exitus am 28.V. um 7h 32' p. m. Sektion sofort. Peritonitis. Im Bauchraum zirka 5 ccm nicht blutiges Exsudat. Eine 3 Std. nach der Entnahme zentrifugierte Probe zeigt bereits purpurrotes Serum!
6h	Infektion					
28. V.	12h	—	+	zahlreich. Kokken	Streptokokken	
	7h 20'	—	+	do.	do.	
	Sektion	—	+	+	+	

Tabelle XXVII.

Streptococcus pyogenes. Kaninchen 82. Intraperitoneale Injektion von 1 Röhrchen 24stündiger Agarkultur. Tod innerhalb 57—69 Stunden.

Datum	Zeit der Entnahme	Hämolyse	Nachhämolyse	Bakteriologischer Befund		
				mikroskopisch	Agarstrich	
1. VI. 1903	Kontrolle	—	—			Lebt am 3. VI. 8h 25' p.m., wird am 4. VI. Früh tot gefund. Sektion 11h 30'. Im Herzblut wenig, in der Milz und Leber massenhaft viel Kokken. Kultur aus Herzblut, Leber u. Milz ergibt Streptokokken.
10h 55'	Infektion					
2. VI.	11h 30'	—	—	0	steril	
3. VI.	12h 45'	—	+	0	Streptokokken	
4. VI.	Sektion	+	+	+	+	

Bei den Streptokokkeninfektionen des Kaninchens zeigt sich eine Schädigung der Erythrocyten lediglich in Form einer Nachhämolyse, eine Hämoglobinämie ist nicht zu beobachten! Der von **Marmorek** ausgesprochene Grundsatz betreffs der in vivo vor sich gehenden Auflösung des Kaninchenblutes besitzt keine allgemeine Gültigkeit, er ist auch in der von **Simon** gewünschten Modifikation nicht haltbar. Bei Kaninchen, welche einige Zeit nach dem Tode zur Sektion gelangen, ist ausnahmslos Hämolyse zu beobachten gewesen. Ob im Sinne der Reagensglasversuche Simons eine Relation zwischen Hämolysinproduktion und erloschener oder herabgesetzter Baktericidie auch im Tierkörper besteht, scheint durch vorliegende Untersuchungen nicht ausgeschlossen, doch mufs eine Klärung dieser Frage von ausgedehnten, zu diesem Zwecke angestellten Versuchen abhängig gemacht werden.

III. Milzbrand.

An Versuchen, das Gift des Milzbrandbazillus etwa in Analogie zum Diphtherie- oder Tetanustoxin aufzufinden, fehlt es nicht. Zahlreiche Untersucher sind bemüht gewesen, durch

mannigfache Variationen der Versuchs- und Kulturbedingungen den Beweis zu erbringen, dafs auch der Milzbrandbazillus ein eigentliches Toxin besitze. Nachprüfungen aber haben Beobachtungen, die von einem Milzbrandtoxin berichten, nicht Stand halten können und wir stehen noch heute auf dem Standpunkte, dafs ein echtes Milzbrandtoxin nicht nachgewiesen erscheint. Aus der umfangreichen Literatur sei hier nur die schöne Arbeit von Conradi ([32]) zitiert, deren Einleitung uns einen historischen Überblick über die Frage des Milzbrandtoxines in erschöpfender Weise bietet. Auch Conradi ist zu dem Resultate gekommen, dafs der Anthraxbazillus ein extrazelluläres lösliches oder ein intrazelluläres Gift im Organismus empfänglicher oder refraktärer Tiere nicht bilde. Er ist ferner der Ansicht, dafs grofse Wahrscheinlichkeit bestehe, dafs der Milzbrand überhaupt keine giftigen Substanzen im Tierkörper erzeuge, und dafs die Hypothese von der Existenz eines Milzbrandgiftes zurückzuweisen sein werde.

Wir haben, als wir unsere Untersuchungen bei injizierten Tieren auch auf die Milzbrandinfektion des Kaninchens ausdehnten, einen überraschenden Befund zu verzeichnen gehabt, der geeignet sein dürfte, die Frage nach der Existenz des Milzbrandtoxines nicht ruhen zu lassen.

Es war in unserer Untersuchungsmethode begründet, zu trachten nicht nur von einem und demselben Versuchstiere möglichst zahlreiche Blutproben untersuchen zu können, sondern auch Proben zu erhalten, die möglichst kurz vor dem Tode entnommen waren. Wir haben ja bei der Besprechung der Streptokokkeninfektionen ganz im Sinne von v. Lingelsheim zeigen können, dafs erst gegen das Lebensende des Tieres zu Veränderungen des Blutes vor sich gehen, welche uns meist als Nachhämolyse erkennbar wurden.

Es ist nun nicht leicht, bei der Milzbrandinjektion beiden Postulaten gerecht zu werden, da wir gerade hier keinerlei Anhaltspunkte dafür besitzen, ob der Tod voraussichtlich in längerer oder kürzerer Zeit eintreten werde. Die individuelle Resistenz der Kaninchen schwankt ja bezüglich des Todes auch bei gut ausprobierten Milzbrandstämmen immerhin um mehrere Stunden

und aus dem Wohlbefinden der Tiere läfst sich durchaus kein Schlufs ziehen, da in den meisten Fällen das Tier noch einen vollständig gesunden Eindruck macht, im nächsten Momente aber schon unter starken Zuckungen apoplektiform zugrunde gehen kann. Die erwähnten Schwankungen, welche in unseren Versuchen zwischen 26 Stunden 45 Min. (frühester Tod) und 49 Stunden 45 Min. (spätester Tod) pendelten, also einen Zeitraum von 23 Stunden beherrschten, liefern den Experimentator mehr minder dem Zufalle aus und nur eine grofse Reihe von Versuchen ermöglichte es uns schliefslich, zu gut verwertbaren Resultaten zu gelangen.

Gleich der erste Versuch brachte uns prinzipiell die wichtigste Orientierung. Das eben vor unseren Augen plötzlich verendete Tier wurde sofort geöffnet, aus dem Herzen rasch eine Blutentnahme gemacht, zentrifugiert und wir fanden das Serum purpurrot gefärbt.

Zahlreiche andere Versuche haben dieses Resultat bestätigt, wir hatten unter 24 Experimenten 8 mal Gelegenheit, die Sektion unmittelbar nach dem Tode vorzunehmen und konnten immer eine Hämolyse konstatieren. Da zwischen Tod und Blutentnahme gewifs nur ein Zeitraum von höchstens 5 Minuten verstrichen war, so werden wir wohl nicht fehlgehen, anzunehmen, dafs diese hier konstatierte Hämolyse als Hämoglobinämie aufzufassen sein wird.

Diesen Befund bei der Milzbrandinjektion des Kaninchens haben wir seinerzeit in einer vorläufigen Mitteilung ([51]) beschrieben und gelegentlich der Naturforscherversammlung in Kassel ([52]) besprochen. Wir glauben, dafs er geeignet sein dürfte, etwas Licht über die Art und Weise der Giftwirkung bei der Milzbrandinjektion zu verbreiten.

Wir sehen, wie gesagt, beim Milzbrandtode des Kaninchens das Blutserum meist purpurrot verfärbt, nur in einem Falle war eine braune Farbe an Stelle der purpurroten getreten. Aus der Literatur wie aus eigenen Versuchen ist uns bekannt, dafs gewifse Mikroorganismen die Eigenschaft besitzen, in vitro unter geeigneten Bedingungen Stoffwechselprodukte zu bilden, welche hämolytisches Vermögen gegen die Erythrocyten der verschiedensten

Tiere sowie des Menschen besitzen. Viele dieser Mikroorganismen, aber durchaus nicht alle, sind Infektionserreger. Wir haben in dieser Arbeit am Staphylolysin gezeigt, daſs dasselbe — in vitro präformiert — Kaninchen in die Blutbahn eingespritzt, eine Auflösung der roten Blutzellen zu bewerkstelligen imstande ist, welche sich entweder als Hämoglobinämie oder als Nachhämolyse dokumentiert. Wir konnten bei der Infektion mit Staphylokokken ganz ähnliche Verhältnisse darlegen.

Wenn wir nun beobachten, daſs mitunter bei Infektionskrankheiten, welche durch in vitro hämolysinbildende Erreger verursacht werden, eine Lösung der Erythrocyten auch im Tierkörper stattfindet, so liegt der Schluſs ja nicht weit, anzunehmen, daſs es sich bei der Milzbrandinfektion vielleicht um den Effekt einer innerhalb des Tierkörpers erfolgten Lysinproduktion von seiten der Milzbrandbakterien handeln könne. Ob dieser Schluſs noch durch den Nachweis einer hämolytischen Substanz in Milzbrandkulturen gestützt wird oder nicht, ist vorläufig ja nicht von Belang, denn es erscheint plausibel, daſs Bakterien im komplizierten Tierkörper Stoffe bilden können, zu deren Aufbau in vitro die Bedingungen vielleicht nicht günstig sind. So annehmbar nun auch diese theoretische Erwägung scheint, so schwierig, vielleicht unmöglich wird es sein, den direkten Nachweis des Lysins im Tierkörper zu führen; er wird nur zu erbringen sein, indem wir die beobachtete Hämolyse als solche gelten lassen. Denn wie wir schon eingangs auseinandersetzten, muſs nach der Ehrlichschen Theorie eine Bindung des Lysins durch die Zelle des Tierkörpers (Erythrocyt) erfolgen und solange wir keine Methode besitzen, um den direkten chemischen Nachweis dieser erfolgten Bindung führen zu können, wird nur die Hämolyse als Folge der Verankerung das einzige Kriterium im Tierversuch bleiben müssen.

Ebenso wie wir also das Staphylolysin für die Schädigung der Erythrocyten bei den Staphylokokkeninfektionen verantwortlich machen können, so ist es wohl auch erlaubt, hypothetisch anzunehmen, daſs der Milzbrandbazillus im Tierkörper ein Lysin, das Anthracolysin bilde, dieses an die Erythrocyten verankert werde und in letzter Folge dann deren Auflösung bedinge und

damit vielleicht auch am Tode des Tieres Anteil habe. Unsere Bemühungen, festzustellen, ob eine Hämolyse schon einige Zeit vor dem Tode aufzutreten pflege, haben mit Ausnahme eines klinisch ganz atypisch verlaufenen Falles (Tabelle XXIX, Nr. 47) gezeigt, dafs bei Entnahmen, welche 1 Stunde 25 Min., 1 Stunde 45 Min. und 2 Stunden 22 Min. vor dem Tode gemacht worden waren (Tabelle XXVIII, Nr. 1, 3, 68), Hämoglobinämie nicht zu konstatieren war, dafs wir aber zu verschiedenen Zeiten in der Lage waren, durch Verwertung der Nachhämolyse den Schlufs auf eingetretene Schädigung der Erythrocyten zu ziehen. Die oben dargelegten Schwierigkeiten verhinderten es, die zwischen letzter Entnahme und Tod verstrichene Zeit unter 1 Stunde 25 Min. herabzudrücken; dafs aber schon 1 Stunde 30 Min. und 2 Stunden 22 Min. vor dem Tode Blutkörperchen geschädigt sind, zeigt uns die Nachhämolyse bei Nr. 68 und 74.

Also auch bei der Milzbrandinfektion tritt die Schädigung der roten Blutzellen spät in Erscheinung, erst in den letzten Stunden vor dem Tode; es besteht da, wie schon oben angedeutet, eine gewifse Ähnlichkeit mit den von v. Lingelsheim für die Streptokokkeninfektion gemachten Beobachtungen. Aber während ja für die Streptokokken Gifte, die mit der Lysinwirkung sicher nichts zu tun haben, beschrieben sind, so fehlen uns beim Milzbrande derartige einwandsfreie Beobachtungen gänzlich.

Sclavo berichtet in neuester Zeit über Lähmungen. Er ([33]) hat Kaninchen mit einem vom Schafe stammenden Milzbrandserum geimpft, um passive Immunität gegen Milzbrand zu erreichen. Die Injektion des Serums wurde intravenös vorgenommen, gleichzeitig das Tier subkutan mit Milzbrandbazillen injiziert. Bei diesem Verfahren nun beobachtete Sclavo in 9 von 352 Fällen das Auftreten von sensiblen und motorischen Lähmungen an den hinteren Extremitäten mit Ausgang in Tod. Die Lähmungen traten meist ziemlich spät, 16 bis 31 Tage nach der Impfung auf. Sclavo meint, dafs durch die Einverleibungen des Serums seine Kaninchen einen gewissen Schutz gegen die Milzbrandinfektion erlangt hätten, welcher es verhinderte, dafs sie in gewöhnlicher Weise akut zugrunde gingen, während die nun

gegebene längere Frist eine Erzeugung des lähmenden Giftes gestatte.

Es scheint in der Tat ab und zu allerdings sehr selten und wohl nur in jenen Fällen, welche klinisch atypisch verlaufen, also solchen, bei denen eine längere Agonie dem Tode vorangeht, zu nervösen Erscheinungen kommen zu können.

Wir sahen unter den Fällen, bei denen wir zur Zeit des Exitus zugegen waren, zweimal einen abnormalen Verlauf der Milzbrandinfektion. In dem einen Falle insofern, als der Tod nicht plötzlich sondern erst nach einem deutlich ausgeprägten längeren agonalen Stadium eintrat, während der zweite Fall mit Lähmungserscheinungen einherging. Da es sich hier durchaus um »neue« Tiere handelte, von denen mit Sicherheit auszuschliefsen war, dafs sie etwa schon einmal im Versuch gestanden hätten, so gewinnt die Beobachtung der nervösen Symptome im zweiten atypischen Falle vielleicht auch noch den Charakter des Einwandes gegen die Auffassung von Sclavo, nachdem ja unsere Tiere keineswegs immunisiert worden waren, sondern der ersten Infektion erlagen. Es müssen da wohl uns noch gänzlich unbekannte Vorgänge im Spiele sein.

Hinsichtlich der Hämolyse boten beide Tiere interessante Befunde. Wir haben ja schon oben konstatiert, dafs bei normalem Verlaufe der Milzbrandinfektion des Kaninchens zirka $2^1/_2$ Stunden vor dem Tode eine Veränderung des Blutes niemals nachzuweisen war, dafs das Tier plötzlich zugrunde geht, ohne vorher wesentliche Krankheitserscheinungen dargeboten zu haben, sowie dafs wir bei der sofort vorgenommenen Sektion in typischen Fällen purpurrotes Serum vorfinden.

Anders verhielten sich die erwähnten Ausnahmen.

Nr. 67 (Tab. XXIX) zeigte schon zirka 3 Stunden vor dem Tode Hämoglobinämie, während sonst ja Schädigungen der Blutkörperchen vor dem Tode immer nur durch Konstatierung der Nachhämolyse zu erkennen waren, und zudem war noch auffallend, dafs dem Tode ein immerhin eine Zeitlang dauernder Somnolenzzustand vorausging. Bei der Sektion zeigte das Serum

nicht den gewohnten purpurroten Farbenton, sondern eine gelbbraune Färbung.

Nicht minder interessant gestaltete sich der Verlauf bei Nr. 47, Tabelle XXIX. Hier begannen ungefähr 33 Stunden nach erfolgter Infektion nervöse Symptome aufzutreten. Das Tier sitzt zunächst mit gespreizten Vorderläufen da, beim Gehen gleiten dieselben nach rechts und links aus. Dann stellen sich Ruderbewegungen ein; die Vorderläufe sind nun bei eingetretener Ruhe senkrecht vom Leibe abgestreckt, die Hinterläufe angezogen. Später nimmt das Tier eine Stellung ein, die der eines sitzenden Frosches in der Haltung der Hinterläufe ähnelt, während die vorderen Extremitäten starr und senkrecht zur Längsachse des Körpers abgestreckt seitlich verharren. Nun verfällt das Tier zusehends, wird so schwach, dafs es auf der Seite liegend verharrt und wird dann, da ein Ende des agonalen Zustandes nicht abzusehen war, getötet. Dieser Fall ist uns leider im Anfange unserer Versuche zur Beobachtung gekommen, zu einer Zeit also, wo wir den Wert der Nachhämolyse noch nicht schätzen gelernt hatten. Später ist uns ein ähnlicher Fall nicht mehr vorgekommen. Das eben erwähnte Tier zeigte bei künstlicher Beleuchtung schwach rosenrotes Serum, das dann bei Tageslicht betrachtet, gelb aussah. Bakterien im Blute wurden sehr frühzeitig nachgewiesen, kulturell schon 16½ Stunden, mikroskopisch (5—7 pro Gesichtsfeld) 6 Stunden vor der Tötung.

Wenn wir aber etwa glaubten, zwischen dem Auftreten der Bakterien im Blute und der Schädigung der Erythrocyten ätiologische Schlüsse ziehen zu dürfen, wird ein Blick in Tab. XXVIII uns überzeugen, dafs wir im Irrtume uns befänden. Bei Nr. 74 sind 10 Stunden vor dem Tode Bakterien im Blute beobachtet, ohne dafs es zur Hämoglobinämie oder Nachhämolyse zu dieser Zeit und in den nächsten Stunden gekommen wäre. Erst 1 Uhr 30 Min. vor dem Tode sehen wir Nachhämolyse auftreten. Erst jetzt können wir die Bakterien nicht nur kulturell wie vorher, sondern auch mikroskopisch feststellen, also als in gröfserer Anzahl auftretend, konstatieren. Wollten wir nun beweisen, dafs offenbar eine gröfsere Menge von Bakterien im Blute (mikro-

skopischer Nachweis) erst eine Alteration der Erythrozyten im Gefolge habe, so könnten wir uns an Nr. 68 und 74 halten, aber Nr. 63 würde uns sofort einsehen lassen, dafs die Richtigkeit dieser Annahme nicht aufrecht zu erhalten wäre.

(Siehe Tabelle XXVIII und XXIX auf S. 250, 251 und 252.)

Wir möchten darauf hinweisen, dafs vielleicht auch bei der Milzbrandinfektion erst nach erfolgter Aufserkraftsetzung des leukozytären Apparates (Knochenmark) nach überwundener Bakterizidie eine Lysinproduktion stattfinde. Dafür scheint uns sehr der Umstand zu sprechen, dafs wir die Schädigung der roten Blutzellen erst in den letzten Stunden nachweisen können. Für die Erklärung der tödlichen Wirkung kann man einmal die Möglichkeit heranziehen, dafs durch die Lysinbindung die betroffenen Erythrozyten für die Respiration unbrauchbar geworden sein können; aber auch noch ein zweiter Punkt verdient Berücksichtigung.

Bei Vergiftungen mit Blutkörperchengiften findet man neben der Auflösung der Erythrozyten meist, wie Kionka ([34]) meint, vielleicht als Folgeerscheinung, die Gerinnungsfähigkeit des Blutes gesteigert, so dafs es zu Gerinnungen im strömenden Blute kommen kann. Dafs dann Embolien wichtiger Zentren auch bei der Milzbrandinfektion eine Rolle spielen können, liegt auf der Hand.

Bei der Milzbrandinfektion des Kaninchens finden wir zur Zeit des Todes eine intensive Hämoglobinämie. Eine Schädigung der Erythrozyten läfst sich schon einige Zeit vor dem Tode als Nachhämolyse erkennen, doch ist die Alteration der roten Blutzellen im allgemeinen erst ein Effekt der letzten Lebensstunden.

Erzeugt der Milzbrandbazillus in künstlichem Nährboden ein Hämolysin?

Die Beantwortung dieser Frage mufste sich logischerweise unseren im vorigen Kapitel dargestellten Untersuchungen anreihen. Die Literatur versagt bei dieser Frage. Nur bei Sobernheim ([35]) finden wir eine kurze Bemerkung bezüglich

Tabelle XXVIII.

Typisch verlaufene Milzbrandinfektionen.

Nummer	Kaninchen	Es sind seit der Infektion verstrichen Stunden	Vor dem Tode Stunden	Nachweis von Bakterien im Blute		Hämolyse	Nach-hämolyse	Tod Stunden nach der Infektion	Zwischen Tod und Sektion sind verflossen Stunden	Bemerkungen
				mikroskopisch	kulturell					
1	Bouillonkultur Anthrax 8* intraperitoneal	1	.	.	.	—		29,45	Sektion sofort	
		2	.	.	.	—				
		6	.	.	.	—				
		23	.	.	.	—				
		28	1,45	.	.	—				
		Sektion	.	+	+	Serum purpurot				
3	Bouillonkultur Anthrax 2 intraperitoneal	2	.	.	.	—		26,45	Sektion sofort	
		19	.	.	.	—				
		25,20	1,25	.	.	—				
		Sektion	.	+	+	Serum purpurot				
62	Agarkultur Anthrax 48 intraperitoneal	normal		.	.	—	—	47,30	Sektion sofort	Keine Hämoglobinurie
		24	23,30	—	18 Kolonien	—	—			
		26	21,30		.	—	—			
		40,45	6,45	—	7 Kolonien	—	—			
		Sektion	.	+	+	Serum purpurot	*)			
63	Agarkultur Anthrax 48 intraperitoneal	normal	.	.		—	—	unbekannt	nicht mehr als 16	Keine Hämoglobinurie
		24,45	.	—	5 Kolonien voll bewachsener Strich	—	—			
		42,30	.	+		—	—			
		46,15	.	+	do.	—	—			
		48,15	.	+		—	—			
		Sektion	.	+	+	Serum purpurot	*)			

Nummer	Kaninchen	Es sind seit der Infektion verstrichen Stunden	Vor dem Tode Stunden	Nachweis von Bakterien im Blute		Hämolyse	Nach-hämolyse	Tod Stunden nach der Infektion	Zwischen Tod und Sektion sind verflossen Stunden	Bemerkungen
				mikroskopisch	kulturell					
68	Agarkultur Anthrax 40 subkutan	normal	.	.	.	—	—			
		6,10	40,30	—	—	—	—			
		23,40	25,22	—	—	—	—			
		31	18,02	—	—	—	—	49,02	Sektion sofort	Keine Hämoglobinurie
		46,40	2,22	+	stark bewachsener Strich	—	+			
		Sektion	.	+	+	Serum purpurrot	*)			
74	Agarkultur Anthrax 73 intraperitoneal	13	36,45	—	—	—	—			
		15	34,45	—	—	—	—			
		18,30	31,15	—	—	—	—			
		19,45	30	—	—	—	—			
		21,45	28	—	—	—	—			
		23,45	26	—	—	—	—			
		26,45	23	—	—	—	—			
		38,15	11,30	—	—	—	—			
		39,45	10	—	2 Kolonien	—	—	49,45	30 Min.	Keine Hämoglobinurie
		41,45	8	—	3 Kolonien	—	—			
		44,15	5,30	—	18—20 Kol.	—	—			
		45,45	4	—	30—40 Kol.	—	—			
		48,15	1,30	+	voll bewachsener Strich	—	Serum purpurrot			
		Sektion		+	+	Serum purpurrot	*)			

*) Eine Verstärkung des Tones über die Farbe »Serum purpurrot« hinaus ist natürlich ohne Feststellung von Zahlen nicht konstatierbar.

Tabelle XXIX.

Atypisch verlaufene Milzbrandinfektionen.

Nummer	Kaninchen	Es sind seit der Infektion verstrichen Stunden	Vor dem Tode Stunden	Nachweis von Bakterien im Blute mikroskopisch	Nachweis von Bakterien im Blute kulturell	Hämolyse	Nachhämolyse	Tod Stunden nach der Infektion		Bemerkungen
67	Agarkultur Anthrax 40 subkutan	normal	.	.	.	—	—			Serum 13′ vor dem Exitus und bei der Sektion gelbbraun, nach 7h und am nächsten Tage zentrifug. Proben weisen den Farbenton »Serum purpurrot« auf. Keine Hämoglobinurie.
		6,05	42,38	—	—	—	—			
		23,15	25,28	—	—	—	—			
		29,45	18,58	—	—	—	—			
		45,45	2,58	+	stark bewachsener Strich	+	+	48,43	Sektion sofort	
		48,30	0,13	+	do.	+	Serum purpurrot			
		Sektion	.	+	+	+	Serum purpurrot			
47	Agarkultur Anthrax 40 intraperitoneal	Kontrolle				—				Sektion. Mikroskopisch in Herzblut, Leber und Milz Milzbrandbazillen. Kultur +
		20		θ	+	—				
		24		θ	+	—				
		25½		+	+	—				
		26½		+	+	—				
		30½		+	+	+ ?				
		31½		+	+	+ ?				
		32½		+	+	+				
		33½		+	+	+				
		34½		+	+	+				
		35½		+	+	+				
		36¾		+	+	+				

des Milzbrandbazillus »in Blutbouillon macht sich schwach hämolytische Wirkung bemerkbar«.

Zunächst untersuchten wir, ob Blut, Bouillonkulturen zugesetzt, gelöst werde. Das Resultat war ein höchst zweifelhaftes. Der mit gewöhnlicher, schwach alkalischer Bouillon angestellte Versuch liefs, in üblicher Weise ausgeführt, von hämolytischer Wirkung der Milzbrandkulturen nicht viel erkennen; erst als die mit Blut beschickten Röhrchen neuerdings auf einige Stunden in den Thermostaten gebracht worden waren, zeigte sich Lösung, konstant in den jüngeren Kulturen bei gewaschenen Blutkörperchen (Kaninchen), aber nur in manchen derjenigen Röhrchen, welchen Kaninchenblut zugesetzt worden war.

Tabelle XXX.

Hämolytisches Vermögen von Milzbrandbouillonkulturen.
(Kaninchenblutkörperchen.)

Alter der Kulturen in Tagen	Gewaschen		Nicht gewaschen	
	a	b	a	b
1	0	+	0	0
2	0	+	0	0
3	0	+	0	0
4	0	+	0	0
5	0	+	0	0
6	0	0	0	+
7	0	0	0	0
8	0	0	0	+
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0

a. Nach dem Blutzusatz 2h bei 37° C, dann über Nacht in der Kälte gehalten.
b. Die a-Proben weitere 12 Stunden bei 37° C gehalten und dann das Resultat notiert.

Der Möglichkeit Rechnung tragend, dafs auch beim Milzbrand der Alkaligehalt der Bouillon von Einflufs auf die Lysinproduktion sein könne, beschickten wir Kolben mit Fleischwasser von verschiedener Alkalinität, nach dem Vorbilde von Neisser und Wechsberg ($^3/_3$, $^2/_3$, $^1/_3$) hergestellt mit Milzbrandbazillen,

bewahrten dieselben bei 37° C auf und prüften nach verschiedenen Zeiten die hämolytische Fähigkeit der Filtrate auf Kaninchenblut (gewaschen). Das Arbeiten mit Bouillonkulturen hatte Schwierigkeiten in der Beurteilung der Resultate ergeben. Die Bouillonen vom Gehalte $^3/_3$ ergaben ein negatives Resultat (7, 14, 21 Tage). Der Kolben von $^2/_3$ Alkalinität, nach 8 Tagen untersucht, liefs ebenfalls ein Hämolysin nicht erkennen. Das nach 14tägigem Wachstum aber gewonnene Filtrat zeigte blutlösende Kraft (Tab. XXXI). Ebenso lieferte ein Filtrat von $^1/_3$ Alkalinität nach 7tägigem Wachstum der Kultur Hämolysin (Tab. XXXII).

Tabelle XXXI.

Filtrat: 14 Tage alte Bouillonkultur Anthrax 74, $^2/_3$ alkalisch, gewaschene Kaninchenblutkörperchen, die inaktiven Proben 1 Stunde bei 65° C gehalten.

Filtrat in 2 ccm	Isotom. Kochsalzlösung in 2 ccm	Aktiv	Inaktiv
2		Flüssigkeit schwach rötlich, rote Kuppe	0
1	1	Spur	0
0,8	1,2	Spur	
0,6	1,4	0	0
0,2	1,8	0	
0,06	1,94	0	
0,02	1,98	0	

Tabelle XXXII.

Filtrat: 7 Tage alte Bouillonkultur Anthrax 74, $^1/_3$ alkalisch, gewaschene Kaninchenblutkörperchen, die inaktiven Proben 1 Stunde bei 65° C gehalten.

Filtrat in 2 ccm	Isotom. Kochsalzlösung in 2 ccm	Aktiv	Inaktiv
2		Flüssigkeit rötlich, sehr starke Kuppe	0
1	1	$^1/_2$ der Flüssigkeit stark rot	0
0,8	1,2	$^1/_4$ der Flüssigkeit stark rot	
0,2	1,8	Spur	
0,06	1,94	0	
0,02	1,98	0	

Um einen besseren Überblick über die Bedingungen zu erhalten, unter denen der Milzbrandbazillus Hämolysin produziert, wurde der in Tabelle XXXIII ausgewiesene Versuch angestellt.

Aus technischen Gründen wurde der im Zusammenhange dargestellte Versuch in zwei Etappen ausgeführt; in der ersten Hälfte untersuchten wir die hämolytische Kraft innerhalb der ersten 12 Tage, in der zweiten die zwischen dem 15. und 24. Tage produzierten Lysinmengen.

(Siehe Tabelle XXXIII u. XXXIV auf S. 256 u. 257.)

Die Filtrate, welche aus $^1/_3$ und $^3/_3$ Bouillonkulturen gewonnen worden waren, lassen jeglichen Einflufs auf die Erythrozyten des Kaninchens vermissen, diese Grade von Alkalinität, die Extreme, scheinen der Hämolysinproduktion des Milzbrandbazillus nicht günstig zu sein. Anders verhält sich die Sache bei den Filtraten der $^2/_3$ Bouillon. Hier fiel uns sofort nach dem Versetzen des Filtrates mit dem Blutstropfen beim Umschütteln auf, dafs das Blut in manchen Röhrchen (Tab. XXXIII in Stab 5, 6, 11, 12, 17 und 18 mit β bezeichnet) Schokoladenfarbe zeigte. Von diesen Röhrchen zeigten nach Ablauf des üblichen Aufenthaltes in Wärme und Kälte einzelne (in der Tab. βl) eine mehr oder minder starke braune Färbung der überstehenden Flüssigkeit. Diese Erscheinung trat bei den gewaschenen Blutkörperchen noch bei einer Verdünnung auf, wo sie bei den ungewaschenen ausblieb, auch hatte das Inaktivieren der Proben keinen Einflufs auf dieses Phänomen gezeitigt. Da wir aus den füheren Versuchen (Tab. XXXI und XXXII) wufsten, dafs das hämolytische Vermögen der Filtrate durch Inaktivieren (1 Stunde bei 65° C) stets aufgehoben worden war, so mufsten wir uns mit der Annahme, dafs es sich hier keinesfalls um eine typische Hämolyse, sondern vielleicht um eine Salzwirkung handeln könne, bescheiden.

Sichere Hämolyse jedoch erzielten wir mit dem Filtrat 15 Tage $^2/_3$ (Stab 29 und 30 der Tab. XXXIII). Doch war die hämolytische Wirkung äufserst schwach, sie äufserte sich in der konzentrierten Lösung (2 ccm Lysin) in rötlicher Färbung, ohne dafs der Tropfen komplett gelöst worden wäre, in den nächsten

Tabelle XXXIII.

Hämolytische Wirkung von Filtraten verschieden alter Milzbrandbouillonkulturen mit verschiedener Alkalinität.
Gewaschene (g) und nicht gewaschene (n) Kaninchenblutkörperchen.

Lysin aktiv in 2 ccm	0,85 proz. NaCl-Lösung in 2 ccm	3 Tage						6 Tage						9 Tage						12 Tage					
		1/3		2/3		3/3		1/3		2/3		3/3		1/3		2/3		3/3		1/3		2/3		3/3	
		g	n	g	n	g	n	g	n	g	n	g	n	g	n	g	n	g	n	g	n	g	n	g	n
2		—	—	β!	β	—	—	—	—	β!	β!	—	—	—	—	β	β	—	—	—	—	—	—	—	—
1	1	—	—	β!	β!	—	—	—	—	β!	β!	—	—	—	—	β	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,8	1,2	—	—	β!	β!	—	—	—	—	δ!	β	—	—	—	—	β	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,6	1,4	—	—	β!	β	—	—	—	—	β	β	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,4	1,6	—	—	β!	β	—	—	—	—	β	β	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,2	1,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,1	1,9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,08	1,92	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,06	1,94	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
inaktiv																									
2		—	—	β!	β	—	—	—	—	β!	β!	—	—	—	—	β	β	—	—	—	—	—	—	—	—
1	1	—	—	β!	β!	—	—	—	—	β!	β!	—	—	—	—	β	β	—	—	—	—	—	—	—	—
0,4	1,6	—	—	β!	β	—	—	—	—	β	β	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26

Lysin aktiv in 2 ccm	0,85 proz. NaCl-Lösung in 2 ccm	15 Tage						18 Tage						21 Tage						24 Tage					
		1/3		2/3		3/3		1/3		2/3		3/3		1/3		2/3		3/3		1/3		2/3		3/3	
		g	n	g	n	g	n	g	n	g	n	g	n	g	n	g	n	g	n	g	n	g	n	g	n
2		—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1	1	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,8	1,2	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,6	1,4	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,4	1,6	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,2	1,8	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,1	1,9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,08	1,92	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,06	1,94	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
inaktiv																									
2		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,4	1,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50

β Chokoladenfarbe des aufgeschüttelten Blutes.
! Braunfärbung der Flüssigkeit.
\+ Rotfärbung der Flüssigkeit (typische Hämolyse).

Proben schwankte der Wert zwischen starker Kuppe und Spur; 0,1 hatte schon keine Wirkung mehr geäufsert. Das Verweilen der Proben bei 65° C durch eine Stunde (Stab 29 und 30) vernichtete die hämolytische Fähigkeit.

Tabelle XXXIV.

Säuregrad der in Tabelle XXXIII verwendeten Filtrate.

Alter der Kultur in Tagen	3	6	9	12	15	18	21	24
Alkaligehalt $^1/_3$ Titre der Bouillon	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
Titre des Filtrates	1,60	1,30	1,30	1,30	1,20	1,15	0,80	1,10
Differenz	+0,80	+0,50	+0,50	+0,50	+0,40	+0,35	0	+0,30
Alkaligehalt $^2/_3$ Titre der Bouillon	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
Titre des Filtrates	1,20	1,10	0,90	0,90	0,90	1,20	1,10	1,10
Differenz	+0,60	+0,50	+0,30	+0,30	+0,30	+0,60	+0,50	+0,50
Alkaligehalt $^3/_3$ Titre der Bouillon	0,40	0,40	0,40	0,40	0,30	0,30	0,30	0,30
Titre des Filtrates	1,00	1,00	1,00	1,00	0,60	0,60	0,60	0,50
Differenz	+0,60	+0,60	+0,60	+0,60	+0,30	+0,30	+0,30	+0,20

Die Zahlen geben an, wieviel Kubikzentimeter einer $^1/_{10}$ n-Lauge zu 5 ccm Bouillon bzw. Filtrat zugesetzt werden mufsten, um mit Phenolphthalein Rotfärbung zu erhalten.

Auffallend ist in unserer Tabelle XXXIII verglichen mit Tabelle XXXII, dafs, während wir in letzterer bei $^1/_3$ Alkalinität Hämolyse konstatiert hatten, hier mit $^1/_3$ Bouillon niemals ein hämolytisch wirkendes Filtrat erzielt wurde, obwohl doch in allen Versuchen ein und derselbe Stamm verwendet worden war. Auch fällt uns auf, dafs die hämolytische Wirkung im allgemeinen sich hinsichtlich ihrer Stärke innerhalb sehr bescheidener Grenzen bewegt. Verglichen mit den starken Graden von Hämolyse, welcher wir im Tier bei der Milzbrandinfektion begegnen, scheint die Aussicht bei dem Milzbrandbazillus aus Bouillonkulturen wirksame Filtrate zu erhalten, recht unsicher und quantitativ wenig Ausbeute versprechend zu sein.

Wie verhält sich der NaCl-Gehalt des Blutes bei der Milzbrandinfektion des Kaninchens?

Zweck der folgenden Untersuchungen war, zu erfahren, ob beim Verlaufe der Milzbrandinfektion eine nennenswerte Änderung im Kochsalzgehalte des Blutes einzutreten pflege; eine solche Änderung des osmotischen Druckes könnte ja durch Ansteigen des Salzgehaltes (Hyperisotonie) oder durch Abfallen desselben (Hypisotonie) die roten Blutzellen zum Austretenlassen ihres Hämoglobins zwingen.

In erster Linie sollten uns einige Untersuchungen an normalem Kaninchenblut Aufschlufs über den Gehalt desselben an Cl geben, welcher Wert dann als NaCl berechnet unseren Resultaten zugrunde liegt.

Nach Abderhalden (12) finden sich in 1000 Gewichtsteilen Blut 2,898 Teile Chlor. Auf NaCl berechnet entspricht diese Zahl einem Gehalte von 4,775 NaCl für 1000 Teile, also 0,47%. Wir haben in unseren Untersuchungen gewogene Blutmengen verascht, die Asche gelöst, in der Lösung den Cl-Gehalt nach Mohr bestimmt und die Werte zusammen auf NaCl% umgerechnet. Tabelle XXXV gibt eine Übersicht über die gefundenen Werte. Nimmt man den Durchschnitt aus den sechs Bestimmungen, so erhalten wir einen Wert von 0,46% NaCl für Kaninchenblut, also eine zu den Analysen von Abderhalden (0,47%) durchaus gut stimmende Zahl.

Tabelle XXXV.

Cl-Gehalt normalen Kaninchenblutes als NaCl% berechnet.

I	0,48	Durchschnitt 0,46%.
II	0,52	Chlorgehalt des Blutes nach Abderhalden auf NaCl% berechnet 0,47%.
III	0,50	
IV	0,45	
V	0,39	Gröfste Differenz normaler Zahlen 0,13.
VI	0,46	

Um den Gehalt des Blutserums an NaCl zu bestimmen, müfste man natürlich eine komplizierte Rechnung anstellen, um den auf die Blutkörperchen selbst entfallenden Wert, für Cl zu

bestimmen, um welchen verringert die für das Blut gefundene Zahl beim Serum Gültigkeit hätte.

Den mit Milzbrand infizierten Tieren wurden von Zeit zu Zeit Blutentnahmen gemacht, der Cl-Gehalt des Blutes wie oben bestimmt und auf NaCl% umgerechnet. Die Zahlen sind in folgender Tabelle verzeichnet.

Tabelle XXXVI.

Cl-Gehalt des Blutes bei Milzbrandinfekt. des Kaninchens berechnet als NaCl.

Nr.	Stunden nach der Infektion	Stunden vor dem Tode	NaCl % Gehalt des Blutes	Differenz zwischen Kontrolle u. Sektionsblut
62	Kontrolle		0,48	
	24	23	0,59	0,01
	41	6	0,52	
	47 (Sektion)		0,49	
67	Kontrolle		0,39	
	24	26½	0,43	0,07
	47½	3	0,48	
	50½ (Sektion)		0,46	
68	Kontrolle		0,46	
	24	25½	0,40	0,11
	47	2½	0,60	
	49½ (Sektion)		0,57	
Gröfste Differenz unter normalen Bluten				0,13

Wie wir sehen, sind keine besonderen Differenzen zwischen den NaCl-Werten des Kontrollblutes (vor der Infektion) und denjenigen des Sektionsblutes zu verzeichnen. Die gröfste Differenz beträgt 0,11. Sehen wir uns in Tabelle XXXV die gröfste Differenz an, welche der NaCl-Gehalt des Blutes bei normalen Tieren aufweist, so finden wir eine gröfsere Zahl, nämlich 0,13. Die Schwankungen dieser Zahlen unter normalen Tieren sind also gröfser als die gröfste Differenz zwischen Normalblut und Sektionsblut eines Milzbrandkaninchens gewesen. Wir glauben also die Annahme einer Störung der Isotonie für die roten Blutzellen des Kaninchens, soweit der NaCl-Gehalt in Betracht kommen könnte und unsere wenigen Versuche ein Urteil gestatten, als ätiologisches Moment für die Hämolyse bei der Milzbrandinfektion als nicht genügend begründet zurückweisen zu müssen.

Aber wir sind imstande, noch einen anderen Beweis dagegen zu führen, dafs Störung der Isotonie bei der Milzbrandinfektion für die Hämolyse verantwortlich zu machen sei.

Wenn im Serum des milzbrandkranken Kaninchens zur Zeit, wo wir eine Schädigung der Erythrozyten nachweisen können, geänderte isotonische Verhältnisse Schuld tragen sollen an der Auflösung, so mufs es uns ja gelingen, durch Einbringen von normalen Blutkörperchen in das kranke Serum dieselben zur Auflösung zu bringen. Dieses Experiment versagt gänzlich; nebenbei sei erwähnt, dafs es mit grofsen Schwierigkeiten verbunden ist, das zum Versuche geeignete Serum zu erhalten. Wir haben schon oben darauf hingewiesen, dafs die Schädigung der roten Blutzellen erst in den letzten Stunden vor dem Tode, und zwar als Nachhämolyse, erkennbar zu werden pflegt. Dafs eine Nachhämolyse eingetreten ist, können wir aber erst am Tage nach der Entnahme konstatieren, und wir wissen zur Zeit derselben noch nicht, ob wir Nachhämolyse beobachten werden; dieser Umstand fordert einerseits möglichst viele Entnahmen, anderseits aber wollen wir ja eine Entziehung gröfserer Blutmengen tunlichst vermeiden. Zu beachten ist auch noch der Umstand, dafs das Serum des entnommenen Blutes nicht mit demselben in Berührung bleiben darf, sondern sofort abgesondert werden mufs, da wir ja im Falle einer Nachhämolyse auch in der Probe, mit welcher wir dann den Versuch zu machen haben werden, Färbung des Serums erhalten würde und eine kolorimetrische Bestimmung dann nicht mehr gut durchführbar wäre.

Tabelle XXXVII und XXXVIII stellt die Resultate dar. In Tabelle XXXVII haben wir zwei Versuche verzeichnet, welche uns zunächst im Kopfe der Tabelle Aufschlufs über das Verhalten des Tieres geben. Wir sehen hier registriert, ob und wann Hämolyse (H) oder Nachhämolyse (NH) aufgetreten sei, wir finden auch angegeben, ob mikropisch (m) oder kulturell (k) zu dieser Zeit Bakterien im Blute nachgewiesen worden seien. Die Versuche wurden so angestellt, dafs die entsprechenden Sera (aktiv und inaktiv) mit normalen gewaschenen Kaninchenerythrozyten gemischt und mit dem Gemisch 3 Kapillaren gefüllt wurden.

Eine dieser Kapillaren wurde sofort zentrifugiert und das abgesetzte Serum neuerdings in eine Kapillare so umgefüllt, dafs keine Blutkörperchen mehr zugegen waren. Dieses Röhrchen diente als Vergleichsobjekt; die anderen Röhrchen blieben bis zum nächsten Tage bei Zimmertemperatur liegen, wurden dann zentrifugiert und mit dem Teströhrchen verglichen. Dieselbe Technik wurde bei Tabelle XXXVIII geübt, nur wurde hier in Stab 4, 5 und 6 Kochsalzlösung an Stelle des Serums verwendet.

In Tabelle XXXVII Nr. 67 kam nun der Umstand zugute, dafs die schon intra vitam aufgetretene und weiter oben bereits genügend gewürdigte Färbung des Serums nicht so intensiv war, dafs es nicht noch möglich gewesen wäre, bei Blutkörperchenzusatz und eventueller Lösung eine Verstärkung des Farbentones zu konstatieren. Auch hier trat keine Lösung der dem Serum zugesetzten normalen Kaninchenerythrozyten ein.

Dafs aber eine Schädigung der Blutkörperchen des kranken Tieres erfolgt war, zeigt uns auch der Versuch in Tabelle XXXVIII, wo sich die Blutkörperchen, in NaCl suspendiert, lösten, während die mit normalen Blutkörperchen angesetzte Kontrolle keine Lösung aufwies. Hier verhalten sich die Blutkörperchen genau so wie die durch Staphylolysininjektion geschädigten Blutzellen, und auch dadurch gewinnt der Schlufs, dafs es sich bei der Milzbrandinfektion um die Bindung von Anthrakolysin, das im Tierkörper erzeugt wird, handle, vielleicht an Wahrscheinlichkeit.

Tabelle XXXVII.

Einflufs des Serums milzbrandkranker Kaninchen auf normale Kaninchenerythrozyten.

H	—	—	—	—	H	—	+	+
NH	—	—	—	+	NH	—	+	+
m	—	—	—	+	m	—	+	+
k	—	—	—	+	k	—	+	+
vor dem Tode	Serum des Tieres vor d. Infektion	25h 42′	18h 22′	2h 42′	vor dem Tode	17h 45′	2h 58′	sofort nach dem Tode
Nr.	a · i	a · i	a · i	a · i	Nr.	a · i	a · i	a · i
68	0 · 0	0 · 0	0 · 0	0 · 0	67	0 · 0	0 · 0	0 · 0

a = aktives Serum. i = inaktives Serum.

Tabelle XXXVIII.

Einflufs des Serums milzbrandkranker Kaninchen auf normale Kaninchenerythrozyten. Nachlösung der kranken Blutkörperchen in isotonischer Kochsalzlösung.

H NH m k vor dem Tode	— — — — ca. 20 Std.	— + — + ca. $3^1/_2$ Std.	— + — + ca. $3^1/_2$ Std.	+ + + Sektion	Kontrolle
Nr. 73	Serum 73 + normale gewaschene Erythrozyten	Serum 73 + normale gewaschene Erythrozyten	Blutkörperchen 73 in 0,85 proz. Na Cl-Lösung	Blutkörperchen 73 in 0,85 proz. Na Cl-Lösung	Normale Blutkörperchen in 0,85 proz. Na Cl-Lösung
1	keine Lösung 2	keine Lösung 3	Lösung 4	Lösung 5	keine Lösung 6

Kreist bei der Milzbrandinfektion des Kaninchens freies Lysin im Serum?

Wir haben dieselbe Frage gelegentlich der Versuche mit Staphylolysin für den Staphylokokkus verneint. Auch für den Milzbrand stehen wir auf demselben Standpunkte, der theoretisch wohl fundiert ist und oben bereits besprochen wurde. Als experimenteller Beweis hätte auch hier das durchaus negative Verhalten der Serumproben in den oben zitierten Tabellen XXXVII und XXXVIII bei Nr. 67, 68 und 73 zu gelten. Im Serum befindliches, freies, nicht verankertes Lysin hätte von den Erythrozyten gebunden werden müssen, welche dann der Lösung anheimgefallen wären.

Warum sehen wir beim Milzbrandkaninchen keine Hämoglobinurie?

Wir konnten bei der Milzbrandinfektion des Kaninchens zeigen, dafs eine sehr intensive Hämoglobinämie bei unmittelbar nach dem Tode vorgenommenen Sektionen bereits vorhanden ist. Da wir ja heute über die Existenz eines Milzbrandtoxins so gut wie nichts wissen, war der Gedanke nur selbstverständlich, den Tod des Milzbrandkaninchens mit der intensiven Auflösung von

roten Blutkörperchen in Zusammenhang zu bringen. Nun wissen wir, dafs es eine ganze Menge von Krankheitsprozessen des Menschen gibt, bei denen Hämoglobinurie aufzutreten pflegt, die ja eine Folge bestehender Hämoglobinämie ist, Hämoglobinurien, die eine Zeitlang anhalten, durchaus nicht immer tödlich enden, sondern in vielen Fällen mit Genesung des Patienten ablaufen. Wir wollen nur an die paroxysmale Hämoglobinurie, an Fälle von Hämoglobinurie bei Scharlach (Heubner) und anderen Infektionskrankheiten erinnern, auch des Schwarzwasserfiebers nicht vergessen. Niemals aber haben wir beim Milzbrandkaninchen Hämoglobinurie beobachten können, obwohl die Intensität der Hämolyse zweifellos so grofs war (purpurrotes Blutserum), dafs für das Zustandekommen einer Hämoglobinurie, soweit es auf die Hämoglobinmenge im Blute ankommt, sicherlich die nötigen Bedingungen gegeben gewesen sein müfsten. Immerhin wollten wir Vergleichsmaterial untersuchen, um bei Vergiftungen mit Blutgiften nachzusehen, wie sich einerseits Auftreten von freiem Hämöglobin im Serum zur Hämoglobinurie verhalte, und wie sich andererseits wiederum die Intensität der Hämolyse zum Erlöschen der Lebensfunktion stellen möge.

Es ist eine bekannte Tatsache, dafs bei subkutaner Einverleibung von Glyzerin beim Kaninchen Hämoglobinämie und Hämoglobinurie sich einzustellen pflegt, während angeblich bei intravenöser Einverleibung die Lösung der roten Blutzellen ausbleiben soll. Filehne (36) erklärt auf Grund von experimentellen Erfahrungen die Vorgänge folgendermafsen: Bei der subkutanen Injektion von Glyzerin treten die die Injektionsstelle passierenden Erythrozyten in Diffusionsverkehr mit dem Glyzerin, verlieren Wasser und die in diesem gelösten Salze, sie schrumpfen; gelangen nun solche Blutkörperchen in normales Blut oder normales Serum, so quellen dieselben vermöge erfolgender Blutwasseraufnahme auf und nun diffundiert der Blutfarbstoff ins normale Serum, die Hämoglobinämie ist da. Bei intravenöser Zuführung des Glyzerins hingegen ist nach Filehne den roten Blutzellen wohl die Diffusionsmöglichkeit gegen das Glyzerin

gegeben, aber es sei hier kein Lösungsmittel und deshalb die Bedingungen zum Austritte des Blutfarbstoffes nicht vorhanden. Ohne weiter diese Ansicht von Filehne diskutieren zu wollen, sei nur erwähnt, dafs wir durch intravenöse Injektion von Glyzerin (10 ccm) beim Kaninchen intensive Hämoglobinämie auslösen konnten. Diese Eigenschaft des Glyzerins nun verwendeten wir, um aus der Intensität der Hämoglobinämie bei der Glyzerinvergiftung eventuelle Rückschlüsse auf den in respiratorischer Hinsicht gewifs nicht zu unterschätzenden Ausfall an roten Blutzellen bei der Milzbrandinfektion ziehen zu können.

Die Versuche wurden mit subkutaner und intravenöser Applikation des Glyzerins angestellt, der Einfachheit halber seien nur erstere besprochen. Nach kurzer Zeit, schon 5 Minuten nach beendeter Injektion des Glyzerins, bemerken wir beginnende Hämoglobinämie, dieselbe ist nach 15—30 Minuten bereits so deutlich erkennbar, dafs ein Zweifel ausgeschlossen erscheint. Starke Grade wurden schon 1 Stunde 40 Minuten nach der Einverleibung beobachtet und bei zwei Tieren, die 1,22% bzw. 1,37% ihres Körpergewichtes an Glyzerin injiziert erhalten hatten, trat der Tod ein, ohne dafs es zur Hämoglobinurie gekommen wäre.

(Siehe Tabelle XXXIX auf S. 265.)

Diese Fälle zeigen, dafs durchaus nicht immer eine Hämoglobinämie auch von Hämoglobinurie begleitet oder gefolgt sein müsse. Dies scheint erst dann der Fall zu sein, wenn die Hämoglobinämie im Tierkörper durch längere Zeit perisistiert und zwar vielleicht gerade in den Fällen, in welchen zunächst durch einige Zeit nur mildere Grade von Hämoglobinämie bestehen. Wir haben in Tabelle 40 einen solchen Fall dargestellt. Das Tier, welches eine viel gröfsere Prozentmenge von Glyzerin erhalten hatte als die beiden vorerwähnten, von dem wir also einen zu mindest ebenso raschen Tod annehmen konnten, erlag der Vergiftung viel langsamer als die anderen. Hier kam es zur Hämoglobinurie, die wir intra vitam und bei der Sektion konstatieren konnten.

Tabelle XXXIX.

Subkutane Injektion von Glyzerin bei Kaninchen. Fehlen der Hämoglobinurie bei starker Hämoglobinämie.

Kaninchen Nr.	Blutprobe Nr.	Seit der Injektion verstrichen	Farbe des Blutserums	
61	1	Kontrolle	fast farblos	Erhält 1,37 % seines Körpergewichtes reines Glyzerin subkutan.
	2	5 Min.	schwach rötlich	
	3	10 Min.	do.	
	4	20 Min.	do.	
	5	30 Min.	stärker rötlich als Nr. 4	Der Blaseninhalt zeigt sich bei der Sektion lichtgelb.
	6	45 Min.	stärker rötlich als Nr. 5	
	7	1 Std.	sehr stark rötlich	
	8	1 Std. 40 Min.	purpurrot	
	9	2 Std. 07 Min.	purpurrot	
	10	2 Std. 11 Min. (Tod, Sektion)	purpurrot	
60	1	Kontrolle	farblos	Erhält 1,22 % seines Körpergewichtes reines Glyzerin subkut.
	2	15 Min.	rötlich	
	3	30 Min.	zunehmende Intensität der Rotfärbung	
	4	50 Min.		Die 15 Min. vor dem Tode vorgenommene Blasenpunktion zeigt hellgelb, nicht hämoglobinurischen Harn.
	5	1 Std. 20 Min.		
	6	1 Std. 50 Min.		
	7	2 Std. 50 Min. Tod, Sektion	stark weinrot	

Tabelle XL.

Kaninchen Nr. 302 erhält 33,8 g Glyzerin (2 % seines Körpergewichtes) subkutan. Hämoglobinämie und Hämoglobinurie.

Nr.	Seit der Injektion verstrichen	Serumfarbe des sofort zentrifugierten Blutes	NH nach 3—4h	NH nach ca 24h	Hämoglobinurie	
1	Kontrolle	fast farblos	—	—		Wurde abends 8h 30' kalt und starr gefunden. Sektion am Vormittag des nächsten Tages. Blase mit dunkelrotem Harn gefüllt.
2	7 Min.	leicht gelbl. Stich	—	—		
3	15 Min.	gelber als Nr. 2	—	—		
4	30 Min.	bräunlich	—	—		
5	45 Min.	rötlichbraun	—	—		
6	60 Min.	stärker als Nr. 5	—	—		
7	1 Std. 18 Min.	wie Nr. 6	—	—	+	
8	3 Std. 18 Min.	purpurrot	—	—		
9	4 Std. 18 Min. Sektion	purpurrot dunkelrot	—	—		

Sehen wir uns nun in unseren Tabellen das Verhalten der Blutsera an, so sehen wir insbesondere bei Nr. 302 in klarer Weise, dafs ein Tier mit einer beträchtlichen Hämoglobinämie immerhin einige Zeit am Leben bleiben kann; im angezogenen Falle war schon 45 Minuten nach der Injektion das Serum rötlichbraun, 3 Stunden 18 Minuten nach derselben purpurrot; diese Intensität hatte durch mindestens eine Stunde, ja wahrscheinlich noch länger bestanden. Noch eine weitere Beobachtung scheint uns von einiger Bedeutung. Betrachten wir bei unseren Milzbrandkaninchen das Verhalten der Blutproben bezüglich der Nachhämolyse, so sehen wir, dafs das Auftreten derselben innerhalb der letzten Lebensstunden die Regel ist. Vergleichen wir aber diesen Befund mit den Beobachtungen an den Glyzerinkaninchen, wo eine Nachhämolyse durchaus zu fehlen pflegt, wo niemals eine Verstärkung der Blutserumfarbe bei 24 Stunden gelagerten Serumproben zu konstatieren war, so werden wir einen Fingerzeig erhalten, wo der Schlüssel zu diesen Vorgängen zu finden sei. Die Hämolyse bei der Glyzerinvergiftung ist wohl zweifellos auf eine Störung der isotonischen Verhältnisse zurückzuführen, nicht aber auf eine Giftbindung, wie wir sie etwa bei den Versuchen mit Kaninchen injiziertem in vitro präformiertem Staphylolysin zeigen konnten. Bei der Glyzerinvergiftung scheinen die Dinge so zu liegen, dafs die durch den Wechsel des osmotischen Druckes geschädigten Erythrozyten im Blute äufserst rasch ihr Hämoglobin abgeben, sonst würden wir ja eine Nachhämolyse regelmäfsig beobachten müssen; bei der Giftbindung (Staphylolysinversuch) mufs ja erfahrungsgemäfs erst eine gewisse Zeit vergehen, ehe die vergifteten Erythrozyten sich lösen. Nun haben wir aber ja bei den Glyzerinversuchen gesehen, dafs eine starke Hämoglobinämie (Serum in unserer Normalkapillare purpurrot) eine Zeitlang ertragen werden kann, ohne dafs der Tod rasch eintritt, wie dies bei der Milzbrandinfektion meist der Fall ist. Das mag ganz richtig sein, aber bei der Milzbrandinfektion sind ja gewifs noch viel mehr Erythrozyten für die Respiration unbrauchbar geworden, als der Hämoglobinmenge entspricht, welche den purpur-

roten Ton des Serums erzeugt. Wir können dies ja aus der Nachhämolyse schliefsen, und so erscheint uns der rasche Tod beim Milzbrandtier gut erklärlich. Dieses rasche Eintreten des Todes (Erstickung?) erklärt auch das Ausbleiben der Hämoglobinurie beim Milzbrandtier.

IV. Bacillus pyocyaneus.

Charrin (37) hat seinerzeit nachgewiesen, dafs Filtrate von Pyocyaneuskulturen, Kaninchen und Meerschweinchen einverleibt, dieselben Symptome hervorzurufen imstande seien, wie dies von seiten der lebenden Bakterien zu geschehen pflegt.

Wassermann (38) hat sich eingehend mit der Frage beschäftigt, ob der Bacillus pyocyaneus ein echtes, von den lebenden Bakterien sezerniertes Toxin produziere, oder ob es sich bei der Giftwirkung abgetöteter Pyocyaneuskulturen lediglich um ein »ausgelaugtes Endotoxin« handle. Wohl mehr dem Standpunkte zuneigend, dafs es sich hauptsächlich um echtes sezerniertes Toxin handle, kommt Wassermann doch zu dem Endergebnis, dafs die Giftwirkung sterilisierter Pyocyaneusbouillonkulturen sich aus der Wirkung echten Toxins und ausgelaugter Endotoxine zusammensetze. Es wird neben der giftigen Eigenschaft des Toxins demselben in neuerer Zeit auch eine blutlösende zugeschrieben, welche prinzipiell und funktionell von demselben verschieden sein soll, etwa in Analogie zum Tetanospasmin und Tetanolysin. Diese hämolytische Eigenschaft der Pyocyaneuskulturfiltrate, mit dem Namen Pyocyanolysin belegt, ist Gegenstand mehrerer allerdings in ihren Resultaten recht divergierender Untersuchungen geworden, die wir im folgenden kurz anführen wollen.

Zuerst haben Bulloch und Hunter (39) angegeben, dafs sich in Bouillonkulturen von Bact. pyocyaneum ein Körper befinde, das Pyocyanolysin, welches im Reagensglase die Erythrozyten des Ochsen, des Schafes, des Kaninchens und anderer Tiere aufzulösen imstande sei. Dieses Gift variiere in verschiedenen Kulturen, sei in jungen in geringerer Menge vorhanden als in

solchen vom Alter von 3—4 Wochen. Durch 15 Minuten langes Kochen unfiltrierter Kulturen werde das hämolytische Vermögen nicht beeinträchtigt, jedoch gehe dasselbe verloren, wenn man Pyocyanolysin enthaltende Filtrate in gleicher Weise behandle. Die beiden Autoren haben sich bei ihren Versuchen einer 0,6proz. Kochsalzlösung bedient.

Weingeroff (40) macht den Versuchen von Bulloch und Hunter den Einwand, dafs ihre Kochsalzlösung von 0,6% nicht isotonisch gewesen sei und er wiederholt gesehen habe, dafs bei dieser Salzkonzentration Erythrozyten sich ohne jeden anderen Zusatz schon gelöst hätten. In der Tat ist ja die Verwendung einer 0,85proz. NaCl-Lösung zu solchen Versuchen heute die allgemein übliche. Bezüglich der Hitzebeständigkeit der Kulturfiltrate stellt sich Weingeroff in direkten Gegensatz zu Bulloch und Hunter, indem er berichtet, dafs ein 30 Minuten währendes Erhitzen auf 120° dem hämolytischen Vermögen seiner Filtrate nicht geschadet hätte. Weingeroff tritt auch für eine prinzipielle Verschiedenheit von Toxin und Hämolysin ein.

Lubenau (26) steigen und wohl mit vollem Rechte, Zweifel auf, ob denn wirklich die Wirkung hämolysierender Piocyaneusfiltrate als »Lysinwirkung« aufzufassen sei. Das Zusammentreffen der starken Lysinwirkung mit stark alkalischer Reaktion der Filtrate ist ihm sehr verdächtig und Lubenau schon meint, »dafs es möglicherweise relativ einfache chemische Bakterienprodukte wie Ammoniak und dergleichen seien, welche das Hämolysierungsvermögen der Bakterienkulturen, wenn auch nicht ganz bedinge, so doch wenigstens einen wesentlichen Anteil daran haben«. Diese Richtigkeit dieser Ansicht wird bedeutend unterstützt, wenn man bedenkt, dafs es Lubenau gelungen ist, durch Neutralisieren der Filtrate auf den Lackmuspunkt eine Verminderung der hämolytischen Wirkung nachzuweisen.

Margarethe Breymann (41) widerlegt einige der Schlufssätze von Bulloch und Hunter und steht auf demselben Standpunkte wie Weingeroff, nachdem es auch ihr nicht gelungen ist, durch Erhitzen von Kulturen oder Filtraten von Piocyaneus eine Inaktivierung zu erreichen.

Loew und Kozai (42) behaupten ebenso wie Weingeroff eine Verschiedenheit zwischen Pyocyaneustoxin und Pyocyaneuslysin.

Jordan (43) aber scheint nun in der ganzen Frage, soweit sie die Reagensglasversuche mit Bouillonkulturen oder Filtraten anbelangt, das richtige Urteil gesprochen zu haben. Nach seinen Versuchen kann man mit steigender oder fallender Alkaleszenz der Filtrate von B. Pyocyaneus die hämolysierende Kraft in gleichem Mafse zu Zu- oder Abnahme veranlassen, ja sie durch Neutralisation zerstören. Mit diesem Befunde erhält die Theorie von der Existenz des Pyocyanolysin in Filtraten einen argen Stofs, jedenfalls aber werden kommende Untersucher gut daran tun, eine Alkaliwirkung im Reagensglase erst sorgfältig auszuschliefsen, ehe sie die hämolysierende Wirkung von Pyocyaneusfiltraten mit Recht einem Pyocyanolysin zuschreiben dürfen.

Untersuchungen über Hämolyse bei mit Bacillus pyocyaneus infizierten Kaninchen.

Wie liegen nun die Dinge bei der Einverleibung von Pyocyaneusbazillen im Tierkörper? Das Meerschweinchen, welches wohl seiner Empfänglichkeit wegen als bestes Testobjekt für für unsere Untersuchungen in erster Linie hätte in Verwendung kommen sollen, konnte aus schon oben ausgeführten Gründen für systematische Versuchsreihen leider nicht in Betracht gezogen werden. Aber die Blutveränderungen am Kaninchen zu studieren, bot auch manche Schwierigkeiten. Bei Einverleibung kleiner Dosen gelingt die tödliche Infektion in vielen Fällen nicht, nimmt man grofse Dosen, so tritt der Tod oft überaus rasch ein und man verfügt nun nicht über eine genügende Zahl von Blutproben; insbesondere bei intraperitonealer Infektion ist dies meist der Fall. Die subkutane Infektion mit relativ grofsen Dosen (etwa 1 Agarröhrchen) bot nun Gelegenheit, an einigen Entnahmen die Verhältnisse gut studieren zu können, später gaben wir gröfsere Dosen Agarkultur auch intraperitoneal, so dafs innerhalb von 1—3 Stunden der Tod eintrat und wir leicht imstande waren, denselben abzuwarten.

Bei der Sektion von Tieren, die akut zugrunde gegangen, aber z. B. nachts gestorben, erst einige Stunden post mortem zur Obduktion gelangten, fanden wir ausnahmslos das Serum von rötlichbrauner, weinroter, purpurroter Farbe, also Befunde, die mit Sicherheit auf Austritt von Hämoglobin im Serum schliefsen lassen. Gelangten die Tiere sofort nach dem Tode zur Sektion, so konnten wir konstatieren, dafs zu dieser Zeit eine Lösung von Blutkörperchen im Serum noch nicht stattgefunden hatte, wohl aber waren die Parallelproben, zur Untersuchung auf Nachhämolyse bestimmt, stets stark rot gefärbt. Auch bei Tieren, welche der Infektion nicht erlagen, konnten wir durch den Befund der Nachhämolyse eine stattgehabte Schädigung der Erythrozyten beweisen. Wir heben hier einen interessanten Befund in Tabelle XLI Nr. 157 hervor. Das Tier hatte ein Röhrchen 48 Stunden alter Agarkultur subkutan erhalten. Zirka 24 Stunden nach der Infektion zeigte sich Nachhämolyse, welche durch einen Zeitraum von mindestens drei Tagen anhaltend die Beeinflussung der Erythrozyten erkennen liefs. Dasselbe Tier erhielt dann später eine zweite Injektion von der doppelten Dosis inzwischen in ihrer Virulenz gesteigerter Kultur, es zeigte keinerlei Erscheinungen von Blutlösung mehr, ging aber dessenungeachtet im Verlaufe von 20 Tagen marantisch zugrunde. Es ist das einer von jenen Fällen, welche uns zur Untersuchung anregen, ob man bei mit lebenden Reinkulturen vorbehandelten Tieren eine gewisse Immunität der Blutkörperchen gegen hämolytische Einflüsse, über die wir zurzeit ja noch wenig orientiert sind, erzielen könne, natürlich ohne eine wirkliche Immunität gegen den betreffenden Erreger zu erreichen. Diese derzeit aufserhalb unseres Programmes gelegenen Untersuchungen sollen demnächst in Betracht gezogen werden, da sie uns hinsichtlich des Immunitätsproblemes nicht ohne Interesse zu sein scheinen. Wir haben oben bei der Staphylokokkeninfektion auf einen Fall aufmerksam gemacht, welcher ganz analog verlaufen ist. In Tabelle XLII sehen wir drei Fälle verzeichnet, welche während der ganzen Zeit von der erfolgten Infektion an genau beobachtet wurden, aufserdem ist ein Fall ([304]) angereiht, welcher

zeigen soll, wie rasch nach dem Tode innerhalb des Tierkörpers Hämolyse eintreten kann. Während bei Nr. 314, 365 und 366 die sofort nach dem Tode entnommene Blutprobe ein Serum zeigte, dessen Farbe sich nicht oder zumindest nicht wesentlich von der der Kontrollprobe desselben Tieres unterschied, sehen wir bei Nr. 304, dessen Sektion sicher nicht später als höchstens 3 Stunden nach dem Tode gemacht wurde, das Serum bereits hämolytisch (rötlichbraun). Auch hier bei der Pyocyaneusinfektion sehen wir also dieselbe Erscheinung, die wir schon bei der Staphylokokken- und Streptokokkeninfektion beobachten konnten, dafs zur Zeit des Todes eine Hämoglobinämie nicht besteht, dafs wir aber die Läsion der Erythrozyten vermittelst der Untersuchung auf Nachhämolyse nachzuweisen imstande sind.

Tabelle XLI.

Pyocyaneusinfektion. Kaninchen Nr. 157. Subkutane Einverleibung.

Datum	Zeiten	H	NH	Gewicht	
20. VIII.	Kontrolle	—	—		Ab 2. XII. wurden täglich Blutproben untersucht, dieselben waren stets negativ, der Kürze halber sind dann weiter nur wenige Tage in der Tabelle verzeichnet worden.
7h 16' p. m.	1 Röhrchen Agarkultur subkutan				
21. VIII.	6 Std. 40 Min.	—	+		
22. VIII.	12 Std. 35 Min.	—	+		
23. VIII.	6 Std. 30 Min.	—	+		
1. XII.	Kontrolle	—	—	2060	
2. XII.	Kontrolle	—	—		
12h 20'	2 Röhrchen Agarkultur subkutan				
	4 Std. 30 Min.	—	—		
3. XII.	11 Std. 55 Min.	—	—	1985	
	5 Std.	—	—		
4. XII.	12 Std. 20 Min.	—	—		
5. XII.	12 Std.	—	—		
6. XII.	12 Std. 30 Min.	—	—		
7. XII.	11 Std. 50 Min.	—	—	1905	
14. XII.	11 Std. 35 Min.	—	—	1570	
21. XII.	11 Std. 15 Min.	—	—	1285	
22. XII.	11 Std. 30 Min.	—	—		
	11 Std. 52 Min.	—	—		
† ca. 5h	Sektion 6 Uhr	—	—		

Tabelle XLII.

Pyocyaneusinfektion. Kaninchen. Grofse Dosen intraperitoneal.

Nr.	Zeiten	H	NH	
314 6. II.	Kontrollle	—	—	Nr. 314. 6. II. Mikroskopisch im Herzblut keine, in Leber und Milzsaft mäfsig zahlreiche Bakterien nachweisbar. Kultur aus Herzblut, Leber und Milz +.
	1^h 2 Agarröhrchen 24^h Kultur intraperitoneal, 2^h (n. 1 Stunde)	—	+	
	Exitus 3^h 03'			
	Sektion sofort	—	+	
365 17. VI.	Kontrolle	—	—	
	12^h 20' 2 Röhrchen 24^h Agarkultur intraperitoneal, 1^h 45'	Serum gelblich stärker als die Kontrolle ± ?	+	
	Exsudat 2^h 28'			
	Sektion sofort	—	+	
366 17. VI.	Kontrolle	—	—	
	Um 12^h 20' Infektion wie bei Nr. 365			
	Exitus 1^h 19'			
	Sektion sofort	—	+	
304 1. II.	Kontrolle	—	—	
	12^h 15' Agarkultur intraperitoneal 1^h 15'	—	+	
	Lebte noch um 2^h, † gefunden 3^h 15'			
	Sektion 5^h	+	—	

Wir haben gesehen, dafs man bei subkutaner oder intraperitonealer Einverleibung entsprechender Mengen von Agarkulturen des Bazilluspyocyaneus beim Kaninchen eine Alteration der Erythrozyten bewirken kann. Zur Erklärung des Zustandekommens der Blutschädigung können wir verschiedene Momente heranziehen.

Konform dem allgemein theoretischen Grundsatz, den wir im Laufe unserer Untersuchungen aufgestellt haben, könnten wir auch hier annehmen, dafs von seiten der Bakterien im Tierkörper ein Lysin gebildet und von den Erythrozyten gebunden wird. Aber wenn wir berücksichtigen, dafs in den auf Tabelle XLII verzeichneten Fällen der Tod (Toxinwirkung) innerhalb von wenigen Stunden eintrat, so können wir uns der

Annahme nicht verschliefsen, dafs wohl auch ausgelaugte Endotoxine, mit hämolytischer Fähigkeit begabt, bezüglich der Hämolyse eine Rolle spielen könnten.

Wir können dieses Kapitel nicht schliefsen, ohne auf einen Einwand zu kommen, den man uns mit unseren eigenen Worten vielleicht machen wollte. Da wir bei Besprechung der Reagensglasversuche mit Hinsicht auf die starke Alkalibildung in Pyocyaneuskulturen kein grofses Vertrauen in die wirkliche Existenz des Pyocyanolysins gesetzt haben, könnte es verwundern, dafs wir von Lysinproduktion im Organismus reden. Wir halten es aber durchaus nicht für ausgeschlossen, dafs Bakteriohämolysine mit pathogenen Bakterien im Reagensglas erzeugt werden können, während bei der Infektion mit dem betreffenden zugehörigen Mikroorganismus Hämolyse ausbleibt und umgekehrt. Auch die bekannte Tatsache, dafs man mit nicht pathogenen Bakterien Hämolysine erzeugen kann, spricht dafür, dafs Reagensglasversuch und Tierinfektion separat beurteilt werden müssen. Die weiter unten bei Tetanus mitgeteilten Erfahrungen werden einen weiteren Beweisgrund für die Richtigkeit dieser Ansicht bilden.

V. Bazillus der Hühnercholera.

Pasteur hat im Jahre 1880 als Erster den Nachweis geliefert, dafs Bakterien unter Umständen lösliche giftige Stoffwechselprodukte absondern und zwar gelang es ihm mit Filtraten von Bouillonkulturen der Hühnercholera bei Hühnern einen Zustand der Schlafsucht hervorzurufen.

Calamida ([44]) hat im vorigen Jahre die Bakterien der Hühnercholera auf ihr hämolytisches Vermögen im Reagensglasversuch geprüft. Die Filtrate von Bouillonkulturen zeigten hämolytische Wirkung auf die Blutkörperchen des Kaninchens, des Meerschweinchens und des Huhnes. Die Tiere sind nach dem Grade der Empfindlichkeit in absteigender Richtung angeführt. Eine toxische Wirkung seines Hämolysins konnte Calamida

nicht erweisen, ebensowenig fand sich ein Leukozidin in den Kulturfiltraten vor.

Wir untersuchten zunächst die Maus auf ihr Verhalten bei der Hühnercholerainfektion.

Eine subkutane Infektion mit einer Öse Agarkultur tötete innerhalb von 17 Stunden. Die Sektion wurde 4 Stunden post mortem vorgenommen. Das Serum zeigte sich rötlich. Eine Wiederholung des Versuches ergab eine Bestätigung des ersten. Wir können also von der Maus zumindest sagen, dafs bei derselben eine Nachhämolyse konstatiert wurde.

Als nächstes Versuchstier wählten wir das Huhn in der Annahme, dafs dieses für die Infektion so empfängliche Tier ein ausgezeichnetes Objekt für unsere Untersuchungen abgeben werde. Unsere a priori wohl berechtigte Annahme erwies sich als trügerisch. Die in den folgenden Tabellen niedergelegten Erfahrungen zeigen deutlich, dafs konstante Resultate beim Huhne nicht zu erlangen waren.

Bisher gewohnt, bei unseren Untersuchungen einen strengen Mafsstab anzulegen und prinzipiell nur solche Proben als hämolytisch zu bezeichnen, welche einen ganz einwandsfreien Befund hinsichtlich ihrer Serumfärbung darboten, kamen wir bei der Beurteilung der Resultate beim Huhne mitunter in recht arge Verlegenheit.

Betrachten wir zunächst Tabelle XLIII Nr. V. Das Tier erlag der Infektion innerhalb 24 Stunden, und wir konnten im Momente des Verendens noch rasch eine Blutentnahme machen. Das Serum erwies sich schwach weinrot, liefs also auf eine Lösung von Erythrozyten bei der Hühnercholerainjektion schliefsen, ein Resultat, das wir eigentlich von vornherein erwartet hatten. Wir liefsen das Tier bei Zimmertemperatur bis zum nächsten Tage liegen und waren sehr verwundert, bei der Sektion keineswegs eine Verstärkung des Farbentones zu finden. Wir hatten doch annehmen zu müssen geglaubt, dafs eine Schädigung der Erythrozyten in reichem Mafse erfolgt sei und eine intensive Färbung des Serums sich nun als Nachhämolyse zeigen müsse.

Der zweite in derselben Tabelle verzeichnete Fall Nr. 289 ergab ein gänzlich anderes Resultat[1]). Hier sezierten wir, eine Blutentnahme in extremis war nicht vorgenommen worden, das Tier sofort nach dem Tode; das Serum zeigte sich diesmal gelb, von einem rötlichen Tone keine Spur. Die zur Konstatierung der Nachhämolyse aber am nächsten Tage zentrifugierten Proben zeigten uns purpurrotes Serum.

Tabelle XLIII.

Infektion mit Hühnercholera beim Huhne.

Datum	Zeiten	H	NH	Bakteriolog. Befund	
				mikroskopisch	Agarstrich
1. XII.	Kontrolle	farblos			
Infektion	6h p. m.				
2. XII.	1h 15'	Stich ins Gelbe	17h nach dem Tode		
	4h	do.	untersuchte		
	5h 45'	do.	Proben zeigen das		
	6h	do	Serum nicht		
Nr. V	6h 10'	do.	wesentlich röter		
	6h 25'	do.	als zur Zeit des		
	† 6h 28'	schwach weinrot	Todes	+	+
15. VII.	Kontrolle	farblos			
Infektion	6h p. m.				
16. VII.	† 10h 45'				
Nr. 289	Sektion sofort	gelb	purpurrot	+	+

Zwischen diesen beiden Fällen, welche wir absichtlich als Extreme aus unseren Protokollen zur Wiedergabe gewählt haben, gibt es nun eine Menge von Zwischenstufen. Wir haben in Tabelle XLIV eine Reihe von Befunden bei der Hühnercholera des Huhnes zusammengefaſst. Die genaue Angabe der Zeit der Infektion, die ungefähre Angabe des Eintrittes des Todes sowie die Angabe der Zeit der Sektion sind wohl nötig, um ein Urteil zu gewinnen, ob eine Nachlösung der Blutkörperchen eingetreten oder ausgeblieben sei. Ein eigentlich in jeder Hinsicht sowohl was Hämolyse als auch was Nachhämo-

[1]) Erst nach unserem Vortrag in Kassel 1903 beobachtet worden.

lyse anbelangt, negativer Fall ist Nr. 18. Trotzdem hier die Sektion mehrere Stunden nach dem Tode vorgenommen worden war, hatte das Serum nur eine leicht gelbliche Färbung, die wir nicht recht als hämolytisch zu bezeichnen uns getrauen würden, eine Rotfärbung war auch nach weiteren 24 Stunden nicht zu bemerken.

Tabelle XLIV.

Huhn. Infektion mit Hühnercholera.

Nr.	Zeit der Infektion	Tod	Zeit der Sektion	Farbe des Serums bei der Sektion	Nach weiteren 24 Stunden
I	13. XI. 4h p. m.	i.d.Nacht zum 14.XI.	14. XI. 4h 30′ p. m.	sehr schwach rötlich	—
II	20. XI. 12h	» » » 21 XI.	21. XI. 12h 30′	bräunlich	—
III	27. XI. 5h 45′	» » » 29.XI.	29. XI. 11h	rötlichgelb	—
IV	1. XII. 6h p. m.	» » » 3.XII.	3. XII. 12h 30′	schwach weinrot	—
V	1. XII. 6h p. m.	2. XII. 6h 28′	3. XII. 11h 30′	rötlichbräunlich	—
132	3. VIII. 6h 30′	i.d. Nacht z. 7.VIII.	7. VIII. 11h 30′	gelbbräunl.	gelbbräunl.
133	do.	do.	7. VIII. 11h 45′	gelbbräunl.	gelbbräunl.
134	do.	5.VIII.zw.7u 10h V.	5. VIII. 12h	rötlichbraun	rötlichbraun
148	20. VIII 12h	i. d. Nacht z. 21.VIII.	21. VIII. 1h 15′	leicht gelbl.	leicht gelbl.
289	15. VII 6h p. m.	16. VII. 10h 45′	16. VII. 10h 45′	gelb	purpurrot

Angenommen, dafs die Blutkörperchen des Huhnes in den Fällen, in welchen eine Färbung des Serums zweifellos konstatiert wurde, durch im Körper von seiten der Hühnercholerabakterien produziertes Lysin geschädigt wurden, so wäre es nicht uninteressant, die Frage zu studieren, ob der Grund des Ausbleibens dieses Phänomens darin zu suchen sei, dafs mitunter vielleicht kein Lysin produziert wurde oder aber, ob nicht etwa manchmal das Hühnerblut einen Antikörper enthält, welcher das Lysin paralysiert. Eins aber scheint uns schon jetzt sicher, dafs bei der tödlichen Hühnercholerainjektion des Huhnes die Schädigung der roten Blutzellen eine sehr geringe Rolle zu spielen scheint, wenigstens insofern, als der Nachweis mit unserer Methode möglich ist.

Unsere nun mit der Taube angestellten Versuche haben dieselben, wenn nicht noch ungenauere Resultate ergeben. Das bei der Sektion mitunter erst Stunden nach dem Tode gewonnene Serum zeigte sich in zwei Fällen durchaus von gleicher Farbe, wie die Kontrolle des normalen Tieres, liefs also durchaus keine Lösung der Blutkörperchen erkennen, in einem Falle war ein geringerer Grad von Nachhämolyse zu konstatieren.

Tabelle XLV.

Taube. Infektion mit Hühnercholera.

Nr.	Zeit der Infektion	Farbe des normalen Serums	Tod	Zeit der Sektion	Farbe des Serums	
					bei der Sektion	24 Stunden später
140	7. VIII. 1h 20′	dunkelgelb	in d. Nacht z. 8. VIII.	8. VIII. 11h 30′	dunkelgelb [1])	dunkelgelb [1])
143	18. VIII. 12h	gelbbräunlich	19. VIII. 7h p. m.	19. VIII. 7h p. m.	gelbbräunlich [1])	gelbbräunlich [1])
144	20. VIII. 12h	gelbbräunlich	in d. Nacht z. 21. VIII.	21. VIII. 12h 45′	bräunlichrot	himbeerrot

Es scheinen sich die kernhaltigen Blutkörperchen der Vögel durchaus anders zu verhalten als die kernlosen Erythrozyten der Säuger, denn, wie wir im folgenden sehen werden, geben Meerschweinchen und Kaninchen bei der Hühnercholerainfektion durchaus befriedigende und glatte Versuchsresultate.

Wir fanden bei Sektionen von Kaninchen, welche einige Zeit nach dem Tode vorgenommen worden waren, immer das Serum purpurrot gefärbt, also war Hämoglobin in beträchtlicher Menge ausgetreten. Wenn wir aber die Sektion unmittelbar nach eingetretenem Tode vornehmen, finden wir keine Färbung des Serums beim Sektionsblute, also keine Hämoglobinämie, wohl aber eine äufserst starke Nachhämolyse.

Ein Hase erhält um 1 Uhr mittags 2 ccm einer mitteldichten Aufschwemmung Agarkultur intraperitoneal. Nach wenigen Stunden erscheint er schwer krank und geht um 5 Uhr 52 Min. zugrunde. Bei der sofort vorgenommenen Sektion zeigt sich viel helles Exsudat im Pleuraraume. Mikroskopisch sind im Herzblut und Brustexsudat ziemlich zahlreiche, in der

1) Farbe genau wie die der Kontrolle.

Leber massenhafte Hühnercholerabakterien nachweisbar. Die Kultur ergibt aus Herzblut, Brustexsudat, Leber und Milz Reinkulturen von Hühnercholera.

Das Serum ist fast farblos, die am nächsten Tage zentrifugierte Parallelprobe purpurrot.

Auch das Meerschweinchen zeigte bei der Hühnercholerainfektion Hämolyse. Ein junges Tier, das innerhalb von 48 Stunden der Injektion erlegen war, zeigte bei der Sektion — das Tier war in der Nacht gestorben und wurde Vormittag seziert — himbeerfarbenes Serum, das nach weiteren 24 Stunden purpurrot war. Ein zweites, altes Tier, das abends 6 Uhr subkutan infiziert wurde, war am nächsten Morgen 8 Uhr 30 Min. noch am Leben, starb zwischen 9 Uhr 30 Min. und 10 Uhr. Bei der um 11 Uhr vorgenommenen Sektion zeigte sich das Serum bräunlich, am nächsten Tage ziegelrot.

Bei Infektionen mit Hühnercholerabakterien zeigten Mäuse und Meerschweinchen bei der einige Zeit nach dem Tode vorgenommenen Sektion Hämolyse. Kaninchen, sofort nach dem Tode untersucht, lassen Hämolyse bzw. Hämoglobinämie nicht erkennen, doch tritt eine intensive Nachhämolyse auf. Bei Tauben und Hühnern ist wohl Hämolyse und Nachhämolyse beobachtet worden, doch ist eine Konstanz dieser Erscheinungen keineswegs zu beobachten gewesen; neben vereinzelten Fällen mit zweifellos positivem Resultate finden sich solche von ausgesprochen negativem, ein eindeutiger Befund ist also bei Huhn und Taube nicht zu verzeichnen.

VI. Tetanus.

Ehrlich ([5]) hat 1898 in Kulturen des Tetanusbacillus einen Körper gefunden, der imstande war, die roten Blutkörperchen mancher Tiere im Reagensglas zu lösen. Er hat gleichzeitig nachgewiesen, dafs das Tetanolysin prinzipiell verschieden sei von der die Krämpfe bewirkenden Komponente des Tetanusgiftes, von dem Tetanospasmin. Der Nachweis wurde erbracht durch Bindungsversuche mit roten Blutzellen, bei denen das

Lysin an die Erythrozyten gebunden wurde. Die nun resentierende Flüssigkeit hatte kein Lösungsvermögen mehr gegenüber den Blutkörperchen, aber die toxische Wirkung war erhalten geblieben. Aufserdem gelang es Ehrlich auch zu zeigen, dafs man für jede der beiden Giftkomponenten für das Lysin und das Spasmin je ein spezifisches Antitoxin darstellen könne.

Man hat versucht, der Wirkung des Tetanolysins neben der des Tetanospasmins bei der Tetanuserkrankung auch eine Rolle zuzuschreiben, vor allem wollte man die Tetanuskachexie durch den Einflufs des Tetanolysins erklären, doch hat diese Annahme keine Freunde gefunden. In diesem negativen Sinne deutet auch v. Lingelsheim die Versuche von Miyamoto[1]), welcher imstande war, mit tetanolysinfreien Filtraten den Zustand der Tetanuskachexie hervorzurufen.

Durch Blutuntersuchungen bei an Tetanus erkrankten Kaninchen haben wir getrachtet, ein eigenes Urteil über diese Frage zu gewinnen.

Wir haben zuerst ein Kaninchen durch Einverleibung von tetanusbazillenhaltiger Gartenerde tetanisch gemacht, als sich dann im Eiter der Infektionsstelle reichliche Tetanusbazillen mikroskopisch nachweisen liefsen, mit dem Eiter kleine Wattebäuschchen getränkt und diese als Infektionsmaterial für weitere Versuche verwendet. Allerdings ist hierbei zu bedenken, dafs wir es in diesen Fällen nicht mit einer reinen Infektion mit Tetanusbazillen zu tun hatten, also die Möglichkeit zu beachten war, dafs positive Ergebnisse (Hämolyse oder Nachhämolyse) durch gleichzeitig eingebrachte Hilfsbakterien verursacht werden konnten.

Bei dem mit Gartenerde infizierten Kaninchen (Tab. XLVI Nr. 114) fanden wir vor Ausbruch der tetanischen Symptome schon am Tage nach der Infektion Nachhämolyse, auch am zweiten Tage dasselbe Symptom; am dritten Tage konnten wir nur mehr eine sehr zweifelhafte (± ?) Nachhämolyse beobachten,

1) Zit. nach v. Lingelsheim, Tetanus im Handbuch von Kolle und Wassermann.

die Untersuchung des bei der Sektion gewonnenen Blutes liefs jeden Anhaltspunkt für eine zu dieser Zeit bestehende Schädigung der Erythrozyten vermissen. Die aus Herzblut, Leber und Milzsaft angelegten aeroben Kulturen erwiesen sich als steril, eine septikämische Infektion von aeroben Bakterien war also nicht erfolgt. Wir nehmen an, dafs in dem erwähnten Falle irgendwelche Bakterien aeroben Charakters im Anfange der Infektion für die Schädigung der roten Blutkörperchen verantwortlich zu machen sind, dafs sie aber am letzten Tage noch irgend eine nennenswerte Rolle gespielt hätten, dafür liegt kein Grund vor. Diese Verhältnisse werden nun noch viel klarer, wenn wir Fall 123 der gleichen Tabelle betrachten. Hier kam es kaum zu einer sicher nachweisbaren Schädigung der Erythrozyten, wir können nur eine zweifelhafte Nachhämolyse beobachten, die bald gänzlich verschwindet. Die letzten Blutentnahmen vor dem Tode und das Sektionsblut lassen wiederum Färbungen des Blutserums vermissen, die aeroben Kulturen bleiben steril. Den gleichen Verhältnissen begegnen wir in dem dritten mitgeteilten Falle Nr. 124. Wir haben also keinen Grund bei der Tetanusinfektion irgendwelche Schädigungen, die durch ein etwa im Tierkörper gebildetes Tetanolysin hervorgerufen sein könnten, anzunehmen, wenigstens insoweit unsere Methode uns ein Urteil gestattet.

(Siehe Tabelle XLVI auf S. 281.)

Um vor falschen Schlüssen hinsichtlich beobachteter Hämolyse zu warnen, mag noch der in Tabelle XLVII verzeichnete Fall kurz besprochen werden. Hier sehen wir ganz ähnlich, wie in den anderen Fällen Nachhämolyse auftreten. Bei der Sektion finden wir aber diesmal das Serum purpurrot gefärbt, ein Befund, der uns leicht irreführen könnte, wenn wir nicht imstande wären, durch den Ausfall der Kultur zu beweisen, dafs hier offenbar ein septikämischer Erreger Hämolyse und Tod herbeigeführt hatte. Das gefundene Stäbchen verhielt sich sehr ähnlich einem von Kolb[1]) beschriebenen Bakterium.

1) Atlas von Lehmann und Neumann, 1896, S. 194.

Tabelle XLVI.

Tetanusinfektion beim Kaninchen (typisch).

		H	NH	Kultur aerob	Kultur anaerob
Nr. 114 [1]					
16. VII.	Kontrolle	—	—		
7h 30' 1/2 g Tetanuserde subkutan					
17. VII.	5h 30'	—	+	Herzblut, Leber, Milz } steril	Tetanus
18. VII.	10h 30' [2]	—	+		
	5h 30'	—	+		
19. VII.	10h 30'	—	± ?		
Exitus	5h 10'				
Sektion sofort		—	—		
Nr. 123 [1]					
21. VII.	Kontrolle	—	—		
11h 35' Tetanuseiterwattebäuschchen subkutan					
	6h	—	—		
22. VII.	11h 30'	—	± ?	Herzblut, Leber } steril	Tetanus
	7h	—	± ?		
23. VII.	1h [2]	—	± ?		
	5h 30'	—	—		
24. VII.	11h 40'	—	—		
11h 43'	Exitus				
Sektion sofort		—	—		
Nr. 124					
22. VII.	Kontrolle	—	—		
6h 30' Infektion wie Nr. 123					
23. VII.	4h 30'	—	+	Leber, Herzblut } steril	Tetanus
24. VII.	6h 30' [2]	—	—		
6h 50'	Exitus				
Sektion sofort		—	—		

Die tetanischen Symptome waren hier nicht zu vollständiger Entwicklung gekommen; offenbar hatte das der Gruppe der Bakterien der hämorrhagischen Septikämie angehörige Stäbchen in seiner Wirkung den Tetanustod sozusagen überholt. Es mufs also zum strengen Postulat für andere Untersucher gemacht

1) Typischer Tetanus.

2) Vgl. v. Sagasser und Posselt, Zur Frage der Serognostik des Tetanus. Zeitschr. f. Heilkunde, 1905.

werden, stets auch durch Anlegen aerober Kulturen aus den Organen des Versuchstieres eine etwaige Wirkung anderer Bakterien zu kontrollieren.

Tabelle XLVII.

Tetanusinfektion beim Kaninchen (atypisch).

	H	NH	Mikroskopischer Befund	Kultur	
				aerob	anaerob
20 VII.	Kontrolle	—	—		
11h Vm. Einbringen eines mit Tetanuseiter getränkt Wattebäuschchens subkut.					
21. VII. 11h 15′	—	±	Tetanusbaz. im Eiter der Infektionsstelle		
6h	—	±	Zahlreiche Tetanusbazillen		
22. VII. 11h [1])	—	+			
6h 45′	—	+			
23. VII. Früh tot gefunden					
Sektion	+			Leber und Herz ein kurzes Stäbchen ähnlich dem Bact. haem. Kolb. Milz: steril.	Tetanus

Die Annahme, dafs vielleicht die bei der Mischinfektion, und das ist ja wohl der Tetanus in der Mehrzahl der Fälle, beteiligt gewesenen Bakterien eine Antikörperproduktion angeregt hätten, als deren Folge eine Neutralisation des vom Tetanusbazillus gebildeten Lysins gedacht werden sollte, scheint uns gezwungen, könnte aber eventuell mit unseren eigenen Versuchen gestützt werden. Bei Mischinfektionen kann nämlich Blutlösung ausbleiben trotz Beteiligung solcher Bakterien, die allein im Tierkörper verbreitet, Hämolyse hervorrufen (vgl. S. 287). Wir möchten aber doch nicht ohne experimentelle Gegenbeweise unsere Ansicht aufgeben, dafs bei der Tetanusinfektion des Kaninchens das Tetanolysin keine Rolle spielt. Jedenfalls sind die vorliegenden Versuche eine neuerliche Bestätigung dafür, dafs ein Parallelismus zwischen Reagensglasversuchen und Tierexperiment nur bedingungsweise und mit Vorsicht konstruiert werden darf.

1) Das der Infektionsstelle zunächst gelegene linke Hinterbein steif weggestreckt; allgemein tetanische Symptome nicht ausgesprochen.

VII. Bacterium typhi.

E. Levy und P. Levy haben in Filtraten von schwach alkalischen Bouillonkulturen des Typhusbazillus ein Hämolysin für Hundeblutkörperchen nachgewiesen. Dieses Hämolysin war durch hohe Wärmegrade nicht inaktivierbar; es gehört also in die Gruppe der hitzebeständigen Bakteriohämolysine. Die genannten Forscher bedienten sich der von Neisser und Wechsberg angegebenen Methodik.

Die Frage, ob der Typhusbazillus für Tiere pathogen sei, wird uns gewöhnlich damit beantwortet, dafs wir bei Tieren wohl nicht mit Infektionen zu rechnen haben, welche der des Menschen etwa gleichwertig an die Seite gestellt werden könnten. Immerhin aber, und das ist für unsere Blutuntersuchungen das wichtigste, besteht die Ansicht zu Recht, dafs im Tierkörper eine Vermehrung der eingebrachten Typhusbazillen, wenn auch im beschränkten Mafse stattfinde; da bei der Typhusinfektion der Tiere ebenso wie bei der des Menschen für das Zustandekommen der eigentlichen Krankheitserscheinungen eine Resorption von Giftstoffen im allgemeinen verantwortlich gemacht wird, so gingen wir daran, auch bei Infektionen mit Typhusbazillen das Verhalten des Blutes von Meerschweinchen und Kaninchen zu studieren.

Fall I. Meerschweinchen Nr. 210 erhält um 12 Uhr mittags ein halbes Röhrchen 24stündiger Agarkultur intraperitoneal. Am nächsten Tag 10 Uhr 15 Min. Exitus. Sektion sofort. Akute Peritonitis.

Mikroskopisch im Herzblute und Lebersaft keine Bakterien nachweisbar, im Bauchexsudat typhusähnliche Stäbchen in Reinkultur. Die Kultur ergab aus Herzblut, Lebersaft und Bauchexsudat nur Typhusbazillen.

Das sofort nach der Entnahme zentrifugierte Blut zeigte keinerlei Färbung des Serums, da letzteres hier fast farblos ebenso wie die Kontrolle gewesen war. Das Serum der nach 24 Stunden zentrifugierten Parallelproben unterschied sich in keiner Weise von dem des Sektionsblutes.

Ein zweiter Fall, in welchem an Stelle der Agarkultur Bouillonkultur verwendet wurde, verlief rascher, indem das Tier schon 8 Stunden nach der Injektion starb. Auch hier war das

Serum bei der sofort vorgenommenen Sektion nicht gefärbt, ebensowenig war eine Nachhämolyse zu konstatieren.

Beim Kaninchen scheinen die Verhältnisse anders zu liegen als beim Meerschweinchen. In Tabelle XLVIII sehen wir einen Fall verzeichnet, dessen Sektion wir unmittelbar nach dem Tode machten. Hier konnten wir innerhalb von 7 Stunden nach erfolgter Infektion beim lebenden Tiere weder Hämolyse noch Nachhämolyse beobachten. Das Tier ging erst am 4. Tage zugrunde. Bei der Sektion fand sich eine ausgedehnte Peritonitis mit viel aber nicht blutigem Exsudate in Bauchhöhle und Pleuraraum. Mikroskopisch waren weder in den Exsudaten noch in Leber oder Milzsaft Bakterien nachweisbar. Die Kultur ergab Wachstum in dem vom Bauchexsudate angelegten Striche, die Kultur am Herzblut blieb steril; das mit Lebersaft beschickte Agarröhrchen liefs nur zwei Kolonien Typhus angeben. Das Serum des Sektionsblutes erwies sich als fast farblos, die am nächsten Tage zentrifugierten Proben zeigten ziegelrotes Serum.

Tabelle XLVIII.

Typhusinfektion beim Kaninchen (Nr. 367).

		H	NH
17. VI.	Kontrolle	—	—
12h 25′ 10 ccm Bouillonkultur intraperitoneal			
	1h 50′	—	—
	7h 30′	—	—
† 21. VI.	9h 30′		
Sektion sofort		—	+

Ein zweiter akutest verlaufener Fall sei noch kurz angeführt. Kaninchen Nr. 214 hatte um 11 Uhr 30 Minuten 10 ccm Typhusbouillonkultur erhalten. Es wurde um 1 Uhr 15 Minuten tot noch warm und ohne Totenstarre gefunden, um 4 Uhr seziert. Hier zeigte sich das Serum braunrot gefärbt, eine Zunahme der Färbungsintensität war nach weiteren 24 Stunden nicht zu beobachten. In letzterem Falle ist es wohl zweifellos, dafs die Einverleibung von Stoffwechselprodukten, also eine

direkte Toxinvergiftung, den Tod herbeigeführt hat. Es lag für diesmal ja nicht in unserem Versuchsplane, zu konstatieren, inwieweit einverleibte Toxine eine Rolle bei der Hämolyse zu spielen pflegen, wir wollten in unseren vorliegenden Untersuchungen ja nur erheben, ob und wann bei Einverleibung von Infektionsmaterial Schädigungen der roten Blutzellen im Tierkörper auftreten.

Bei der Infektion mit Typhusbazillen zeigt das Meerschweinchen weder Hämoglobinämie noch Nachhämolyse. Das Kaninchen läfst ebenfalls Hämoglobinämie vermissen, zeigt jedoch intensive Nachhämolyse.

VIII. Bacterium coli.

Auch von diesem Mikroorganismus ist ein Stoffwechselprodukt bekannt, welches hämolytische Eigenschaft besitzt. Es ist das Verdienst von Kayser (46), das Kolilysin studiert und beschrieben zu haben. Es gehört ebenso wie das Typhuslysin zu den hitzebeständigen Lysinen, es verträgt Siedehitze, ohne an Wirksamkeit einzubüfsen.

Bei Infektionen des Meerschweinchens mit Kolibazillen konnten wir nur konstatieren, dafs bei Tieren, welche einige Zeit nach dem Tode zur Autopsie gelangten, ausnahmslos das Serum braun, bräunlichrötlich oder rötlich gefärbt war. Es ist uns hier nicht gelungen, den Eintritt des Todes abzuwarten; die Zeiten schwankten so sehr, dafs Zeitbestimmungen selbst mit Opferung einer ganzen Nacht sich als trügerisch erwiesen und uns niemals Gelegenheit gegeben war, die Sektion unmittelbar nach erfolgtem Tode vorzunehmen.

Anders beim Kaninchen. Hier waren wir in der Lage, einige Sektionen gleich nach dem Exitus auszuführen und die Blutuntersuchung ergab, dafs das Serum zu dieser Zeit ungefärbt, dafs Hämoglobin in demselben nicht gelöst ist. Die nach 24 Stunden untersuchten Parallelproben zeigten Nachhämolyse. Tabelle XLIX verzeichnet zwei Fälle. Es gilt hier bezüglich der Toxinwirkung dasselbe, was wir bei der Typhusinfektion

erwähnt haben, nur fällt hier bei Nr. 361 auch noch die starke Wirkung größerer Mengen intraperitoneal eingebrachter Agarkulturen auf.

Tabelle XLIX.

Koliinfektion beim Kaninchen.

		H	NH
Nr. 361			
17. VI.	Kontrolle	—	—
12^h 15' zwei Agarröhrchen Kultur intraperitoneal			
	1^h 25'	—	—
†	5^h 05'		
Sektion sofort		—	+
Nr. 363			
17. VI.	Kontrolle	—	—
12^h 15' 5 ccm 48stünd. Bouillonkultur			
†	1^h 13'		
Sektion sofort		—	+

Mit Bacterium coli infizierte Meerschweinchen zeigen bei der einige Zeit nach dem Tode vorgenommenen Sektion **Hämolyse.**

Kaninchen lassen zur Zeit des Todes keine Hämoglobinämie erkennen, jedoch ist die Schädigung der Erythrozyten in Form einer Nachhämolyse ausgesprochen.

IX. Diplococcus pneumoniae Fränkel-Weichselbaum.

Wir haben bei der Tetanusinfektion zeigen können, daſs eine Schädigung der Erythrozyten bei dieser Erkrankung keine Rolle zu spielen pflegt, wenigstens insoweit der Tetanusbazillus allein in Betracht kommt. In gröſserer Zahl pflegt es zur Verbreitung des genannten Mikroorganismus im Blute und in den Organen im Sinne einer septikämischen Erkrankung nicht zu kommen, wenn auch das Vorkommen in Milz, Herzblut, Gehirn, Muskel und Unterhautzellgewebe entfernt von der Impfstelle

nach den Untersuchungen von Tizzoni, Zumpe und v. Öttinger sowie v. Hibler einwandfrei nachgewiesen erscheint[1]).

Im Diplococcus pneumoniae F. W. sehen wir nun einen Typus von Bakterien repräsentiert, welcher trotz septikämischer Verbreitung in Blut und Organen eine Schädigung der roten Blutzellen nicht erkennen liefs.

Wir infizierten ein Kaninchen subkutan mit Sputum, welches normalerweise die typischen Diplokokken zu beherbergen pflegte. Das Tier starb am 3. Tage nach der Infektion und wurde sofort seziert. Insbesondere zahlreich waren hier die Bakterien im Herzblute zu finden. Blutproben, die aus dem Herzen und aus der Leber entnommen wurden, liefsen, weder sogleich noch nach 24 Stunden zentrifugiert, eine Färbung des Serums erkennen. Es ist also bei der Infektion des Kaninchens mit Diplokokkus Fränkel und Weichselbaum eine Lösung der Erythrozyten weder als Hämoglobinämie noch als Nachhämolyse konstatierbar gewesen.

Über die Toxinbildung des Diplokokkus Fränkel-Weichselbaum ist noch wenig Sicheres bekannt geworden; nach Weichselbaum (47) neigt man der Ansicht zu, dafs das spezifische Toxin an die lebende Bakterienzelle gebunden sei, also in die Gruppe der Endotoxine gehöre. Wenn wir dieser Auffassung Rechnung tragen, so wäre nach unseren Erfahrungen noch hinzuzufügen, dafs dieses Endotoxin des Diplokokkus im Verlaufe der Infektion beim Kaninchen keine hämolytische Endotoxinkomponente zu äufsern scheint, da Hämolyse im Tierversuch nicht auftrat.

X. Über Hämolyse bei Mischinfektionen.

Der Bericht über unsere Erfahrungen bei Infektionen, welche durch einen einzigen Infektionserreger verursacht worden waren, soll nicht abgeschlossen werden, ohne auf das schwierige und noch so wenig geklärte Kapitel der Mischinfektionen ein wenig Rücksicht genommen zu haben.

1) Zit. nach v. Lingelsheim, Tetanus im Handbuch von Kolle und Wassermann.

Wir hatten nicht die Absicht gehabt, den hier so kompliziert liegenden Verhältnissen experimentell näher zu treten, aber im Laufe der Untersuchungen haben sich ab und zu bei den Sektionen interessante Befunde ergeben, von denen der eine oder der andere noch in Kürze mitgeteilt werden soll.

Wir haben gelegentlich der Infektion mit Bazillenpyocyaneus (Kaninchen) gesehen, dafs eine Schädigung der Erythrocyten aufzutreten pflegt, welche wir stets als Nachhämolyse konstatieren konnten. Gelegentlich dieser Versuchsreihen beobachteten wir auch einen Fall (Tab. L) welcher — mit Pyocyaneus infiziert — im Sektionsblute die Nachhämolyse vermissen liefs. Da wir glücklicherweise gerade bei diesem Falle die einzelnen Entnahmen sowohl mikroskopisch als kulturell genau auf ihren Bakteriengehalt untersucht haben, so bot der Sektionsbefund mit den während des Lebens gemachten Beobachtungen zusammengehalten ein aufserordentlich instruktives Bild. Am Tage nach der Infektion, auch noch am zweiten Tage nachher, sehen wir Nachhämolyse auftreten — wohl als Folge der Pyocyaneusinfektion — weiterhin hört diese Erscheinung auf und das Sektionsblut zeigt nun ebenfalls einen hinsichtlich der Erythrocytenschädigung völlig negativen Befund. Die genaue bakteriologische Untersuchung aber zeigt uns, dafs wir im Blute und den Organen des ja unmittelbar nach dem Tode sezierten Tieres nicht weniger als dreierlei voneinander verschiedene Bakterienarten vertreten finden Einmal im Herzblute kurze dicke, nicht weiter bestimmte Stäbchen und Staphylokokken, in der Leber Bacillus Pyocyaneus und die erwähnten kurzen Stäbchen, in der Milz endlich wiederum das Stäbchen und aufserdem noch Staphylokokken.

(Siehe Tabelle L auf S. 289.)

Das angeführte Beispiel dokumentiert uns wohl in eindringlicher Weise, dafs bei derartigen Untersuchungen die ausgiebigste Anwendung aller uns zur Verfügung stehenden bakteriologischen Behelfe in den einzelnen Phasen der Infektion eine dringende Notwendigkeit ist, um zunächst einwandsfreie Resultate zu erhalten. Von diesen bis zum vollen Verständnis des Mechanismus

der Mischinfektion liegt ja leider noch ein weiter und verschlungener Weg. Hatten wir im eben beschriebenen Falle von Haus aus die Wirkung unseres Erregers auf die roten Blutkörperchen ja gekannt und die ausgebliebene vermifst, so lagen in einem anderen Versuche die Verhältnisse umgekehrt.

Tabelle L.
Mischinfektion bei ursprünglicher Infektion mit Bacillus pyocyaneus (Kaninchen Nr. 89/III).

		H	NH	Bakteriologischer Blutbefund: mikroskopisch	Bakteriologischer Blutbefund: Agarstrich
16. VI.	Kontrolle	—	—		
5h 30' Agarkultur intraperitoneal					
17. VI.	11h 30'	—	± ?	0	2 Kolonien Pyocyaneus
18. VI.	12h 15'	—	+	0	steril
	7h	—	+		
19. VI.	6h 30'	—	—	0	Pyocyaneus rein
20. VI	11h 30'	—	—	0	1 Kolonie kurze dicke Stäbchen
†	12h 42'				
Sektion sofort		—	—	Herz, Leber, Milz: 0	Herz: Kurze dicke Stäbch. + Staph. Leber: 2 Kolonien Pyocyaneus + 12 Kolon. kurze dicke Stäbchen Milz: Kurze dicke Stäbch. + Staph.

Um bei einem Meerschweinchen Tetanus zu erzeugen, hatten wir demselben ein mit Tetanuseiter getränktes Wattebäuschchen subkutan eingebracht. Das Eiter war durch subkutane Impfung mit tetanushaltiger Gartenerde von einem Kaninchen gewonnen worden. Es war also natürlich, dafs dasselbe neben Tetanusbazillen auch noch andere Bakterien enthalten mufste. Das Tier starb in der auf den Infektionstag folgenden Nacht, ohne tetonische Symptome dargeboten zu haben, da wohl die Zeit zur Entwicklung derselben zu kurz gewesen war. Bei der Sektion nun fand sich eine ausgedehnte mit diffusen Blutungen durchsetzte ödematöse Infiltration der Brust- und Bauchmuskulatur, im Anschlusse an die Infektionsstelle sich ausbreitend. Mikroskopisch fanden sich an der Infektionsstelle die verschiedensten Formen von Bakterien neben Tetanusbazillen auch ferner an die

Bakterien des malignen Ödems erinnernd, im Ödem zahlreiche kurze plumpe Stäbchen in Reinkultur.

Das Serum des Tieres zeigte weder bei der Sektion noch nach weiteren 24 Stunden irgend eine Verfärbung, also war eine Lösung der Erythrozyten mit Sicherheit auszuschliefsen.

Die bakteriologische Untersuchung des Ödemsaftes sowie der Organe wurde mit aeroben und anaeroben Kulturmethoden vorgenommen. Die aerobe Kultivierung ergab das erwähnte plumpe Stäbchen aus Ödemflüssigkeit, Herzblut und Leber in Reinkultur, während in den anaeroben von der Impfstelle und dem Muskelödem angelegten Kulturen aufser Tetanusbazillen noch verschiedene andere Bakterien wuchsen. Als wir nun eine Reinkultur des sonst nicht weiter bestimmten aeroben plumpen Stäbchens, das seinem Verhalten nach in die Gruppe der Bakterien der hämorrhagischen Septikämie zu gehören schien, einem zweiten Meerschweinchen inokulierten, erlag dasselbe der Infektion innerhalb von 48 Stunden; die Blutuntersuchung ergab deutliche Hämolyse! Da nun ja diese Erscheinung bei dem anderen Meerschweinchen ausgeblieben war, so unterliegt es wohl keinem Zweifel, dafs bei der Mischinfektion sich Vorgänge abgespielt hatten, welche von der normalen Wirkung des in Reinkultur applizierten Stäbchens wesentlich abwichen, indem Hämolyse das eine Mal (Reinkultur) beobachtet, das andere Mal aber — Mischinfektion — vermifst wurde.

Schlufswort.

Fassen wir die Resultate der vorstehenden Untersuchungen kurz zusammen, so haben wir hinsichtlich der durch Bakterieninfektionen (beim Kaninchen) bewirkten oder ausbleibenden Blutlösung, wenn wir Hämoglobinämie und Nachhämolyse in Betracht ziehen, drei grofse Gruppen zu unterscheiden. Eine, bei der wir sofort nach dem Tode, also auch zur Zeit des Todes, keine Lösung von Erythrozyten, jedoch deren Schädigung als Nachhämolyse konstatieren können, während wir bei der zweiten unmittelbar nach dem Tode intensive Hämoglobinämie beobachten. Die dritte Gruppe umfafst jene Infektionen, bei denen

zur Zeit des Todes weder eine Hämoglobinämie noch auch Nachhämolyse nachzuweisen ist, bei denen also eine Schädigung der roten Blutzellen keine besondere Rolle zu spielen scheint.

Zu Gruppe I gehören die Infektionen mit Streptokokken, Bacillus pyocyaneus, Hühnercholera, Bacterium coli und Typhusbazillen. Gruppe II vertritt die Milzbrandinfektion. Gruppe III repräsentieren der Diplokokkus pneumoniae Fränkel und Weichselbaum und die Tetanusinfektion.

Die Staphylokokkeninfektionen teilen sich je nach ihrem Verlauf in Gruppe II oder III. In erstere gehören die hochakuten, in letztere die chronischen Fälle mit multipler Abscedierung. Ziehen wir aber die Grenzen noch enger und basieren wir die Einteilung nur auf Lösung oder Nichtlösung der Erythrozyten, ohne den Lösungsmodus zu spezialisieren, so können wir zwei Typen der Infektionen aufstellen, solche, in derem Verlaufe eine Bakterienwirkung auf die roten Blutzellen auftritt: hämolysierende und solche, in denen keine Wirkung sich äufsert, nichthämolysierende Infektionen.

Dem Wesen der Hämolyse seien noch einige Zeilen gewidmet.

Über die Konstitution jenes von Bakterien gelieferten Körpers, der im Reagensglase Erythrozyten löst, sind wir zurzeit noch völlig im Unklaren. Uns sagt die Bezeichnung Staphylolysin, Tetanolysin usw. nichts anderes, als dafs gewisse Bakterien Stoffe bilden, welche, in vitro präformiert, imstande sind, in vitro Erythrozyten zu lösen. Dafs manche dieser Stoffe, Tieren einverleibt, dieselbe Wirkung ausüben, konnten wir für das Staphylolysin zeigen, dafs aber durchaus nicht alle Bakterien, welche in vitro ein Hämolysin erzeugen, auch bei Infektionen im Tiere Blutkörperchen lösen, haben wir beim Tetanusbazillus gesehen. Bevor noch die moderne Forschung sich mit den Bakteriohämolysinen befafste, hatte man die Eigenschaft mancher Sera, heterogene Blutkörperchen zu lösen, studiert, aber trotz vieler dieses Gebiet bearbeitenden Untersuchungen sind die Beobachter heute noch über Wirkungsweise und Konstitution der Serumhämolysine nicht einig. Zwei Richtungen stehen sich gegenüber.

Buchner, Bordet, Ehrlich treten dafür ein, dafs rein chemische Vorgänge als Gründe für die Hämolyse im heterogenen Serum aufzufassen seien, während in neuester Zeit insbesondere v. Baumgarten (49) den Standpunkt vertritt, »dafs osmotische Prozesse eine mafsgebende Rolle bei Hämolyse im heterogenen resp. Immunserum spielen«.

Wir haben dieses Gebiet in unserer Arbeit nicht betreten, denn die wenigen Versuche, in denen es sich darum handelte, nachzuweisen, ob z. B. Milzbrandkaninchenserum normale Kaninchenerythrozyten löse, gehören ja nicht hierher, die Aufgabe, die wir uns gestellt hatten, ist ja eigentlich mit dem Nachweise und der Aufstellung der grofsen Hauptgruppen »hämolysierende und nicht hämolysierende Infektionen« gelöst, aber die Gründe, die für und wider bei der Serumhämolyse geltend gemacht werden, fallen ja möglicherweise auch bei der Bakteriohämolyse und den Bakteriohämolysinen ins Gewicht, und von diesem Standpunkte aus möchten wir ein oder das andere Versuchsresultat noch einmal Revue passieren lassen.

Der wohl interessanteste Befund bei sämtlichen Infektionen ist die intensive Hämoglobinämie, die wir zur Zeit des Todes beim Milzbrandkaninchen fanden. Schon einige Zeit vor dem Tode zeigen uns Proben mit erfolgter Nachhämolyse an, dafs eine Schädigung der Erythrozyten eingetreten sei.

Handelt es sich hier um Giftbindung oder um Anisotonie des Mediums, in dem die roten Blutzellen sich befinden, also des Serums?

Von dem Gedanken ausgehend, dafs vielleicht im Blute durch die zirkulierenden Bakterien ein Abbau des Kochsalzes erfolge und dadurch eine Hypotonie des Serums bedingt sein könne, haben wir ja oben den Kochsalzgehalt in verschiedenen Phasen der Infektion bestimmt, aber keine Verminderung desselben gefunden. Doch da wäre immer noch die Möglichkeit gegeben, dafs bei normalem Kochsalzgehalt der Gesamtsalzgehalt des Blutes, das wir ja nicht bestimmt haben, verändert, herabgesetzt worden sein konnte, und trotz normalen NaCl-Gehaltes eine Hypo-, event. eine Hypertonie des Plasmas bestanden haben

könne. Dagegen sprechen deutlich die Versuche mit Milzbrandkaninchenserum und normalen Erythrozyten, die hätten gelöst werden müssen, wenn das Serum nicht isotonisch gewesen wäre. Eine Anisotonie des Mediums hat also hier keine Rolle gespielt. Wir wenden uns also der zweiten der herrschenden Ansichten zu, der Theorie der Giftbindung. Direkte Beweise hierfür lassen sich begreiflicherweise schwer geben, so lange wir keine Methoden des chemischen Nachweises besitzen, wir werden immer nur auf Analogieschlüsse angewiesen sein und auch negative Momente, wie der Nachweis, dafs mangelnde Isotonie für eintretende Hämolyse nicht verantwortlich zu machen gewesen sei, werden die Gifttheorie zu stützen haben. Zur Ansicht Ehrlichs, dafs wir uns die Giftwirkung im Erwirken der Durchlässigkeit der diffusionsverhindernden Membran der Erythrozyten vorzustellen haben, liefert Pascucci ([50]) in einer Arbeit aus dem Hofmeisterschen Institute einen instruktiven Beitrag. Er konnte zeigen, dafs Blutgifte ganz verschiedenen Ursprungs und Charakters (Saponin, Solanin, Kobragift und Tetanotoxin) Lecithin-Cholesterinmembranen alterieren und permeabel machen. Dieser Vorgang lief um so rascher ab, je geringer der Cholesteringehalt der Membran bemessen wurde. Nun tritt Pascucci auf Grund des chemisch-physikalischen Verhaltens der Erythrozyten dafür ein, dafs wir uns die Blutkörperchen nicht mit einem »schwammartig aufgebauten protoplasmatischen Gerüst« ausgestattet zu denken haben, sondern als bläschenförmig gebaute Körper, deren Membran das Stroma bildet, vorstellen sollen. Nach den Ausführungen desselben Beobachters besteht nahezu ein Drittel der Trockensubstanz der Stromata aus Lecithin und Cholesterin, und Pascucci wirft die Frage auf, ob es nicht unter den geschilderten Verhältnissen gestattet sei, anzunehmen, »dafs die Wirkung der blutscheibenlösenden Gifte nicht ganz oder doch in erster Reihe durch chemische Einwirkung, auf die die Membran zusammensetzenden Stoffe zustande kommt«. Die Ansicht hat gewifs etwas Bestechendes. Ob sie für die Infektion im Tierkörper geltend gemacht werden kann, mufs erst durch entsprechende Versuche erwiesen werden, doch scheint uns die

Auffassung Pascuccis mit unserer Ansicht vereinbar, dafs bei Infektionen das die roten Blutzellen schädigende Agens, das hypothetische Bakteriohämolysin (etwa nach Pascucci eine Lecithin und Cholesterin lösende Substanz) von seiten der Bakterien im Tierkörper produziert werde.

Literatur.

1. R. Koch, Konferenz zur Erörterung der Cholerafrage. Berliner klin. Wochenschr. 1884, Nr. 32.
2. Bitter, Über die Fermentausscheidung des Kochschen Vibrio der Cholera asiatica. Arch. f. Hygiene, Bd. V, 1886.
3. Van de Velde, Étude sur le mécanisme de la virulence du staphylocoque pyogène. La Cellule, X, p. 403.
4. Bail, Über leukozide Substanzen in den Stoffwechselprodukten des Staphylokokkus pyogenes aureus. Archiv f. Hygiene, Bd. 30 u. 32.
5. Ehrlich, Berliner klin. Wochenschr. 1898, Nr. 12.
6. Madsen, Über Tetanolysin. Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 32, 1899.
7. Kraus und Ludwig, Über Bakterienhämolysine und Antihämolysine. Wiener klin. Wochenschr., 1902, S. 382.
8. Schur, Über Hämolyse. Hofmeisters Beiträge 1902.
9. v. Limbeck, Grundrifs einer klinischen Pathologie des Blutes. 1896, Fischer, Jena.
10. Nolf, Annales de l'nstitut Pasteur, 1900.
11. Löwit, Experimentelle Studien zur intravasalen Bakteriolyse. Sitzungsberichte der Kaiserl. Akademie der Wissenschaften in Wien, mathematisch-naturwissenschaftl. Klasse. Bd. CXIII, 1904.
12. Abderhalden, Zur quantitativen vergleichenden Analyse des Blutes. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiolog. Chemie. Bd. 25, 1898.
13. Hans Sachs, Zur Kenntnis des Kreuzspinnengiftes. Hofmeisters Beiträge 1902.
14. Neisser und Wechsberg, Über das Staphylotoxin. Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 36, 1901.
15. Meinicke, Über die Hämolysine der choleraähnlichen Vibrionen. Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 50, 1905.
16. Kraus und Clairmont, Über Hämolysine und Antihämolysine. Wiener klin. Wochenschr. 1900.
17. Bajardi, Sulla presenza di proprietà emolitiche dei filtrati di brodoculture degli stafilocochi etc. Annali d'Igiene sperimentale 1901. Ref. im Zentralblatt für Bakteriologie, Referate 1902, Bd. 31.
18. van Durme, Über Staphylokokken und Staphylolysine. Hygienische Rundschau 1903.

19. Kutscher und Konrich, Untersuchungen über die Beziehungen von Hämolysinbildung und Agglutinabilität der Staphylokokken. Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 48, 1904.

20. Fränkel und Baumann, Über Hämolysinbildung und Agglutination der Staphylokokken. Münchener med. Wochenschr. 1905, Nr. 20.

21. Bordet, Contribution à l'étude du Serum antistreptococcique. Annales de l'Institut Pasteur, 1897.

22. v Lingelsheim, Aetiologie und Therapie der Streptokokkeninfektionen. v. Behrings Beiträge 1900.

23. Besredka, De l'Hémolysine streptococcique. Annales de l'Institut Pasteur. Tome 15. 1901.

24. Schlesinger, Experimentelle Untersuchungen über das Hämolysin der Streptokokken. Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 44, 1903.

25. Neisser und Lipstein, Die Staphylokokken. Handbuch von Kolle und Wassermann.

26. Lubenau, Hämolytische Fähigkeit einzelner pathogener Schizomyceten. Zentralbl. f. Bakteriologie, Bd. 30.

27. Aronson, Untersuchungen über Streptokokken- und Antistreptokokkenserum. Berliner klin. Wochenschr. 1902.

28. Meyer, Zur Einheit der Streptokokken. Berliner klin. Wochenschr. 1902.

29. Breton, De l'hémolysine produite par le streptocoque dans l'organisme infecté, und Sur l'obtention d'une antihémolysine streptococcique. Ref. i. Zentralbl. f. Bakteriol., Bd. 34, S. 526.

30. Simon, Untersuchungen über die Gifte der Streptokokken. Zentralbl. f. Bakteriol. Bd. 35.

31. Kerner, Experimenteller Beitrag zur Hämolyse und zur Agglutination der Streptokokken. Zentralbl. f. Bakteriol., Bd. 38, 1905.

32. Conradi, Zur Frage der Toxinbildung bei den Milzbrandbakterien. Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 31, 1899.

33. Sclavo, Über die toxischen Lähmungen karbunkulöser Natur. Zentralbl. f. Bakteriol., Bd. 32, 1902.

34. Kionka, Blutgifte. Handbuch von Lubarsch & Ostertag VII. 1900/1901.

35. Sobernheim, Milzbrand im Handbuch von Kolle und Wassermann.

36. Filehne, Weshalb erzeugt intravenöse Einbringung von Glyzerin weniger sicher Hämoglobinurie als subkutane? Virchows Archiv, Bd. 117.

37. Charrin, La maladie pyocyanique. Paris 1889.

38. Wassermann, Bacillus pyocyaneus. Handbuch von Kolle und Wassermann.

39. Bulloch und Hunter, Über Pyocyanolysin, eine hämolytische Substanz in Kulturen des Bacterium pyocyaneum. Zentralblbl. f. Bakteriol. Bd. 28.

40. Weingeroff, Zur Kenntnis des Hämolysins des Bacillus pyocyaneus. Zentralbl. f. Bakteriol. Bd. 29.

41. Margarete Breymann, Über die Stoffwechselprodukte des Bacillus pyocyaneus. Zentralbl. f. Bakteriol., Bd. 31. Literatur.

42. Loew und Kozai, Über die Bildung des Pyocyanolysins unter verschiedenen Bedingungen. Tokyo Imperial University. Vol. IV, Ref. i. Zentralbl. f. Bakteriol., Bd. 32.

43. Jordan, Über die Natur des Pyocyanolysins. Zentralbl. f. Bakteriol., Bd. 33.

44. Calamida, Das Hämolysin des Bazillus der Hühnercholera. Zentralbl. f. Bakteriol., Bd. 35.

45 E. Levy und P. Levy, Über das Hämolysin des Typhusbazillus. Zentralbl. f. Bakteriol., Bd. 30.

46. Kayser, Über Bakterienhämolysine, im Besonderen das Kolilysin. Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 42.

47. Weichselbaum, Diplococcus pneumoniae im Handbuch von Kolle und Wassermann.

48. Marmorek, Die Arteinheit der für den Menschen pathogenen Streptokokken. Berliner klin. Wochenschr. 1902.

49. v. Baumgarten, Ergebnisse der osmologischen Forschung über Hämolyse in Zikel: Osmologische Diagnostik und Therapie. Berlin 1905.

50. Olinto Pascucci, Die Zusammensetzung des Blutscheibenstromes und die Hämolyse. Hofmeisters Beiträge 1905, Bd. 6.

51. v. Wunschheim, Über Hämolyse bei experimentellen Infektionen. Münchener med. Wochenschr., 1903, Nr. 26.

52. Derselbe, Verhandlungen der Gesellschaft deutscher Naturforscher und Ärzte. Kassel 1903.

Weitere Erfahrungen über Aggressinimmunität gegen den Shiga-Kruseschen Dysenteriebazillus.

Von

Dr. Yonetarō Kikuchi.

(Aus dem Hygienischen Institut der deutschen Universität in Prag. Vorstand: Prof. Hueppe.)

In einer vorläufigen Mitteilung (»Wiener kl. Wochenschrift« 1905, Nr. 17) wurde bereits über Versuche berichtet, vermittelst der Aggressine des Shiga-Kruseschen Dysenteriebazillus empfängliche Tiere aktiv und passiv zu immunisieren. Die Versuche sind seither weiter geführt worden, ohne noch mit völlig befriedigenden Resultaten abgeschlossen werden zu können. Da aber äufsere Umstände zu einer langen Unterbrechung zwingen, mögen die erzielten Ergebnisse hier mitgeteilt werden, besonders da sie bereits erkennen lassen, welche Verhältnisse besonders bei der Immunisierung gegen den Dysenteriebazillus und bei der eventuellen Herstellung eines Heilserums für den Menschen in Frage kommen können.

Der Shiga-Krusesche Dysenteriebazillus gehört seiner Wirkung im Tierversuche nach in die nächste Nähe des Choleravibrio, Typhus- und Kolonbazillus. Es handelt sich um die Gruppe der fakultativ invasiven oder Halbparasiten, deren Hauptkennzeichen in ihrer sehr geringen Aggressivität besteht. Sie vermögen erst in einer gewissen Anzahl von Individuen im Körper (der Bauchhöhle) geeigneter Lebewesen so viel Aggressivität aufzubringen, um sich reichlich zu vermehren. Auch dann aber

bleibt ihr Wachstum in der Hauptsache ein lokales, wesentlich nur auf die Infektionsstelle beschränktes, im Gegensatze zu den echten Parasiten, die nach dem Eindringen eines einzigen Individuums in den Körper denselben ohne Hemmung durchwachsen.

Es ist wohl kaum ein Zufall, dafs die typischen Vertreter der Halbparasiten, Cholera, Dysenterie und Typhusbazillen auch bei der natürlichen Infektion des Menschen, namentlich im Darme, zur ersten Entwicklung gelangen, wo sie unter saprophytischen Verhältnissen erst zu der nötigen Individuenzahl heranwachsen, um dann, nach Ausbildung der Aggressine mehr oder weniger oberflächlich ins Gewebe eindringend, Krankheit zu erzeugen.

Auch in bezug auf die nähere Wirkungsweise ergeben sich tiefgreifende Unterschiede zwischen echten und Halbparasiten. Während bei ersteren trotz ihrer unbegrenzten Vermehrung im ganzen Tierkörper nichts Deutliches von Giftbildung und Giftwirkung aufzufinden ist, und man sehr grofse Mengen toter Bazillen anwenden mufs, um Tiere zu vergiften, wenn dies überhaupt gelingt, ist bei letzteren die Vergiftung der Versuchstiere unmittelbar einleuchtend.

Es ist kaum zu bezweifeln, dafs die sehr leichte Auflösbarkeit der Halbparasiten durch Körpersäfte, wie auch aufserhalb des Organismus mit der Vergiftung in ursächlichem Zusammenhange steht. Anderseits wieder hängt die leichte Löslichkeit der Bakterien sicher mit der sehr leichten Entstehung hoher bakteriolytischer Eigenschaften des Blutes nach Vorbehandlung mit Halbparasiten zusammen. Im Gegensatze dazu sind echte Parasiten wenig lösungsfähig und wiederholte Einspritzung derselben im abgetöteten Zustande erzeugt keine oder nur geringe Anhäufung von bakteriolytischen und agglutinierenden Eigenschaften des Blutes.

Dazu kommt noch ein weiteres Merkmal in dem Verhalten gegen Leukozyten, worauf besonders in neuester Zeit geachtet wurde. Echte Parasiten, wie Hühnercholera, sind nach Versuchen von Weil[1]), vorausgesetzt, dafs keine künstliche Abschwächung

1) Archiv f. Hygiene, 2. Heft.

stattgefunden hat, der Phagozytose so gut wie nicht unterworfen[1]); ebenso wie bei Milzbrand können bei geringer intraperitonealer Infektion Leukozyten in beträchtlicher Zahl in die Bauchhöhle übertreten, ohne dafs Phagozytose zu beobachten wäre. Diese findet hingegen bei Halbparasiten stets statt, wenn nur nicht die Infektion eine derartige war (grofse Bazillenmenge, gleichzeitige Aggressineinspritzung), dafs Leukozyten ferngehalten wurden. Der Begriff der Virulenz hat mit diesem Verhältnisse wenig zu tun; ob ein Typhus- oder Dysenteriebazillus mit $^1/_{50}$ oder mit 5 Ösen tötet, stets findet bei Anwendung einfach oder wenig mehrfach tödlichen Dosen starke Hyperleukozytose und Phagozytose statt, und bei Verwendung von vielfach tödlichen Mengen bleiben Leukozyten bei den wenig wie bei den hochvirulenten aus; die wenigen, meist am Netze abgelagerten Zellen zeigen dennoch Phagozytose.

Es liegt also diesem abweichenden Verhalten gegen die Zellen wie gegen die Flüssigkeiten des Körpers eine vollkommene gegensätzliche Organisation von Halbparasiten und echten Parasiten zugrunde, und es ist klar, dafs diese Feststellungen auch auf das Vorgehen bei der aktiven Immunisierung und der Herstellung von Immunserum nicht ohne Einflufs bleiben können.

Wenn denselben im folgenden noch nicht überall Rechnung getragen ist, so liegt die Ursache darin, dafs diese Umstände erst im Laufe der Immunisierungsversuche von Prof. Bail mit Typhus und Cholera und der eigenen mit Dysenterie ermittelt wurden.

Aus den eben erwähnten Darlegungen geht hervor, dafs für die Erzielung einer aktiven Immunität zur Verhütung einer drohenden und für die Herstellung eines Serums zur Heilung einer bereits ausgebrochenen Krankheit verschiedene Wege eingeschlagen werden können.

Die aktive Immunisierung kann nach dem bisherigen Stande der Kenntnisse eine zweifache sein und entweder Bakteriolyse oder Antiaggressivität erzielen wollen. Mittels ersterer sollen

1) Vgl. Zilberberg und Zeliony, Annales de l'Institut Pasteur, 1901, S. 615.

sollen die Infektionserreger abgetödet werden, noch ehe sie sich im Körper in gefahrdrohender Weise vermehren können. Dafs dieses Ziel bei der intraperitonealen Impfung von Meerschweinchen verhältnismäfsig leicht und sicher erreicht werden kann, ist sicher bewiesen. Ob das, was für einen intraperitonealen Versuch gilt, auch auf die natürliche Menscheninfektion übertragen werden darf, ist aber fraglich. Denn zunächst hat Bail zeigen können, dafs die Abtötung von Typhusbazillen, die in der Meerschweinchenbauchhöhle relativ glatt und rasch erfolgt, schon innerhalb der Organe nicht in gleicher Weise sich sichtbar machen läfst; ob durch die bakteriolytische Fähigkeit des Blutes innerhalb des Darmlumens überhaupt eine Wirkung erzielt werden kann, mufs aber als sehr unsicher erscheinen. Die klinischen Erfahrungen von Stern, Korte und Steinberg, Jürgens, wonach trotz ausgebildeter, natürlich erworbener bakteriolytischer und agglutinierender Fähigkeiten Typhusrezidive nicht verhütet werden, sprechen nicht dafür. Da in neuerer Zeit durch Wright in England, durch das Institut für Infektionskrankheiten [1]) in Deutschland Menschenimpfungen zur Erzielung aktiver Immunität gegen Typhus angewendet worden sind, wird ihr Ergebnis abgewartet werden müssen. Für die Choleraimpfungen nach Haffkin, die Dysenterieimpfung von Shiga u. a. gilt das Gleiche.

Inzwischen mufs aber angesichts der erwähnten Bedenken das Bestreben berechtigt erscheinen, die zur Verfügung stehenden Impfmethoden durch Einführung und Erprobung der Aggressinimmunität zu vermehren. Ihr Prinzip weicht von der bakteriolytischen Immunisierung sehr beträchtlich ab.

Hier handelt es sich nicht so sehr um Abtötung der in den Körper bereits eingedrungenen Bakterien, die mindestens bei Typhus schon in den Organen und wohl ebenso im Darminhalt schwer zu erreichen sein dürfte. Ein direkter Angriff auf die Lebensfähigkeit der Infektionserreger wird hier gar nicht beabsichtigt, nur die Aggressivität derselben, d. h. die Ausschaltung

1) Klinisches Jahrbuch, Bd. XIV, Heft 2 (Gaffky, Kolle, Hetsch und Kutscher).

der natürlichen Schutzkräfte des Organismus soll aufgehoben werden.

Bail hat diese Immunisierung bereits mit der antitoxischen verglichen, welche sich ebenfalls nicht so sehr um die Erreger als um ihr Gift, also das eigentlich krankmachende Agens kümmert.

Für Halbparasiten nach Art des Dysenteriebazillus ist die Aggressivität aber die unerläfsliche Voraussetzung der Krankheit: denn nur die Ausbildung von Aggressinen ermöglicht es dem so labilen Bazillus im normalen Tierkörper bis zur krankheitserzeugenden Menge heranzuwachsen.

Gelingt es, durch passive oder aktive Immunisierung einen »antiaggressiven Körperzustand« herzustellen, so bleiben die Schutzkräfte des Organismus, die sonst gelähmt werden, tätig und beseitigen früher oder später die Krankheitserreger.

So einleuchtend diese Vorstellungsweise ist, so bedarf sie doch nach der Eigenart der halbparasitischen Dysenteriebazillen und den inzwischen über Aggressinimmunität gemachten Erfahrungen mehrfacher Ergänzungen.[1]) Das Studium der Aggressinimmunität gegen echte Parasiten hat nämlich das eigentümliche Resultat gehabt, dafs zwar, wie vorauszusehen war, eine rasche Abtötung der Bazillen im Tiere nicht stattfindet, dafs aber gelegentlich auch eine sehr bedeutende Vermehrung im immunen Organismus eintreten kann, ohne dafs diese von den geringsten Krankheitserscheinungen begleitet ist. Namentlich die schönen Versuche von Weil mit Hühnercholera und Schweineseuche im Peritoneum aktiv und passiv immuner Meerschweinchen haben dies deutlich gemacht.

Aber auch für Milzbrand fand Bail im immunen Tiere lange Zeit Bazillen. Sobernheim, dessen Milzbrandimmunität sicher eine antiaggressive ist, fand sogar Vermehrung im kreisenden Blute. Keine der gegenwärtig geltenden Anschauungen über

1) Ich bin Herrn Prof. Bail und Herrn Dr. Weil für die gütige Überlassung ihrer diesbezüglichen, ausführlich erst später zu veröffentlichenden Erfahrungen zu grofsem Danke verpflichtet.

Immunität vermag sich mit diesen Feststellungen abzufinden, als die Aggressintheorie. Denn sobald nur die Aggressine durch den Immunzustand paralysiert sind, hat die Vermehrung, die ja doch nicht eine schrankenlose Durchwucherung bedeutet, keine gröfsere Wichtigkeit als das Bakterienwachstum etwa in der Mundhöhle. Schliefslich fallen die Bakterien doch den Körperschutzkräften zum Opfer. Die grofse Bedeutung der Unterscheidung von obligat invasiven Parasiten und Halbparasiten zeigt sich also gerade hier wieder sehr deutlich.

Parasiten im natürlich virulenten Zustande unterliegen der Auflösung durch die Körpersäfte, wie der Phagozytose so gut wie gar nicht und wahrscheinlich deshalb wirken sie nicht unmittelbar vergiftend. Anders bei den Halbparasiten und unter diesen ganz besonders bei Dysenteriebazillen.

Sie unterliegen der Phagozytose wie der Auflösung durch Körpersäfte sehr leicht. Erstere stellt die unschädliche Beseitigungsweise dar, denn dadurch wird das etwa freiwerdende Gift sofort unschädlich gemacht. Letztere bedeutet die plötzliche Resorption von Endotoxin. Denn es ist wohl kaum zu bezweifeln, dafs sowohl die Giftwirkung im Exsudate infizierter Tiere als die in älteren Bouillonkulturen auf gelöste Endotoxine zurückzuführen ist. Da man nun gezwungen ist, zur erfolgreichen Infektion eines Tieres mit Dysenteriebazillen grofse Mengen zu injizieren, so kann auch trotz bestehender Antiaggressivität Vergiftung eintreten, wenn nicht, wie dies Regel ist, Leukozyten das Gift paralysieren. Erfolgt aber im immunen Tiere, so wie bei der Immunität Weils gegen Hühnercholera Vermehrung so bedeutet das bei Halbparasiten eine Giftanhäufung, der gegenüber auch die Leukozyten schliefslich versagen müssen. Es ist also das, was bei einem Parasiten für den Tierkörper ganz unschädlich ist, bei einem Halbparasiten gefährlich.

Aus diesen Darlegungen geht hervor, dafs die Immunität gegen den Dysenteriebazillus eine ganze Reihe von Momenten berücksichtigen mufs, unter denen aber dem gegen die Giftwirkung gerichteten unter allen Umständen eine sehr grofse Bedeutung zukommt. Diese kann wieder in zweifacher Weise er-

folgen: durch Erzeugung einer direkten Antitoxinimmunität und durch Steigerung der normalen Giftbindung durch die Leukozyten. Dafs die Zellen dazu imstande sind, wurde bereits bewiesen [1]); wenn solche rasch und reichlich zuströmen, so können sie durch Phagozytose an der Zerstörung der Bazillen in ungefährlicher Weise arbeiten und überdies das sonst entstandene Gift beseitigen. In der Tat sind aktiv aggressinimmune Tiere, wie bereits angeführt wurde, dazu imstande. Aber solche werden auch bis zu einem gewissen Grade antitoxisch immun sein, da das zur Injektion verwendete Peritonealexsudat dysenterischer Meerschweinchen aufser Aggressin auch Gift enthält und dieses im Blute vorbehandelter Tiere Antitoxin erzeugen kann. In der Tat sind Meerschweinchen nach zweimaliger Injektion sterilen, auch von toten Bazillen so viel als möglich befreiten Aggressins völlig immun, auch gegen schwere Infektion, die für Kontrolltiere in kurzer Zeit tödlich ist. Aufser den bisher angeführten Beispielen seien noch zwei Versuche hierüber angeführt:

Tabelle I.

Nr.	Vorbehandlung	Infektion	Tod	Bemerkungen
90	12. XII. 1,0 ccm Aggressin subkutan 28. I. 1,5 ccm Aggressin subkutan	12. II. 2 Agarkulturen i. perit.	lebt	Nach 1 Std. merkt man viele Haufen von Bazillen, vielfach um Leukozyten herum. Nach 2 Std. hochgradige Haufenbildung der Bazillen. Die Haufen liegen vielfach, aber nicht sämtlich, um Leukozyten herum. Nach 3 Std. sind sowohl die Haufen wie die Phagozytose verschwunden. Freie Bazillen fehlen in dem leukozytenreichen Exsudate. Lebt.
152	Kontrolle	wie 90	in der Nacht	Nach 1 Std. massenhaft Bazillen. Nach 2 Std. deutliche, starke Vermehrung; einige Leukozyten. Nach 3 Std. keine Zunahme der Leukozyten, von denen einige schwache Phagozytose zeigen. Enorme Bazillenmengen. Die Sektion ergibt das Bild schwerer Infektion.

1) Berliner klin. Wochenschr., 1905, Nr. 15.

Tabelle II.

Nr.	Vorbehandlung	Infektion	Tod	Bemerkungen
91	12. XII. 1,0 ccm Aggressin subkutan 28. I. 1,5 ccm Aggressin subkutan	13. II. 2,5 ccm Exsudat von T. 152 i. perit.	lebt	Nach 1 Std. haben sich alle Bazillen zusammengeballt. Leukozyten, davon die polynukleären mit schwacher Phagozytose, bereits zahlreich. Nach 2 Std. haben die Bazillen stark abgenommen, die Zahl der Leukozyten ist sehr gestiegen. Hochgradige Phagozytose. Nach 3 Std. nur vereinzelte Bazillen noch zu finden. Weitere Vermehrung der Leukozyten, nur noch hie und da mit Phagozytose. Nach 4 und 7 Std. reiner Eiter ohne Bazillen. Das Tier sieht krank aus, erholt sich am nächsten Tage.
153	Kontrolle	Wie 91	nach 8 Std.	Nach 1 Std. wenig Lymphozyten, massenhaft Bazillen ohne Haufenbildung. Nach 2 Std.: In dem von Bazillen dicht erfüllten Tropfen finden sich vereinzelte polynukleäre Leukozyten mit Phagozytose. Nach 3 Std. noch weniger Leukozyten wie vorher. Ununterbrochene Vermehrung der Bazillen. Nach 4 u. 7 Std. fast nur Bazillen im Exsudate. Sektionsbefund der schwersten Infektion.

Durch eine einmalige Injektion von sterilem Aggressin konnte bisher eine sichere und ausgiebige Immunität gegen grofse Bazillenmengen nicht erzielt werden.

Tabelle III.

Nr.	Vorbehandlung	Infektion	Tod	Bemerkungen
214	0,5 ccm steriles Aggressin subkutan	Nach 15 Tg. $1\frac{1}{2}$ Agarkultur i. perit.	in der Nacht	Kein Unterschied gegen 216.
215	1,5 ccm steriles Aggressin subkutan	wie 214	nach 24 Std.	Nach $\frac{1}{2}$ Std. trat undeutliche, nach 2 Std. auffallend starke Haufenbildung ein. Nach 3 Std. erschienen viele polynukleäre Leukozyten mit starker Phagozytose, und die Zahl der Bazillen nahm ab. Nach 7 Std. trat wieder Vermehrung der Bazillen ein, trotz reichlichem Leukozytengehalt der Bauchhöhle. Die Sektion lieferte das Bild einer leichten Infektion mit dickem eitrigem Exsudate und reichlichen Auflagerungen.
216	Kontrolle	wie 214	in der Nacht	Bild schwerster Infektion mit progressiver Bazillenzunahme ohne Leukozytenzutritt.

Was die Immunisierungsmethode betrifft, so ist bisher allerdings eine einfache Injektion von 0,5 und 1,5 ccm Aggressin noch nicht hinreichend gewesen, um vollständige Immunität gegen grofse Bazillenmengen zu verleihen, was bei Typhus nach dem Versuche von Bail leicht gelingt. Immerhin ist der Infektionsverlauf bei Meerschweinchen 215 bereits ein weit leichterer als der der anderen Tiere, so dafs die Wirkung der immunisierenden Aggressininjektion bereits ganz klar hervortritt. Es ist dazu weiter zu bemerken, dafs es sehr auf die Stärke des verwendeten Aggressins ankommt, worauf in den bisherigen Versuchen noch nicht genügend geachtet worden war. Wenig wirksame Aggressine hinterlassen, ebenso wie durch Erhitzen auf 60° gröfstenteils zerstörte, nur sehr geringe Immunitätsgrade, von denen es dazu noch sehr unsicher ist, ob es nicht etwa Spuren von bakterizider Immunität sind.

In allen Versuchen mit aktiver Aggressinimmunität tritt das rasche und reichliche Erscheinen der Leukozyten deutlich hervor. Was das Verhalten der Bazillen betrifft, so wird über die merkwürdige Haufenbildung im Tierkörper noch unten einiges zu sagen sein. Wodurch die Bazillen selbst zugrundegehen, ist mit aller Sicherheit bisher noch nicht festgestellt worden. Eine typische Granulabildung wurde nur selten und stets nur in sehr geringem Grade beobachtet; von den bakteriolytischen Lösungserscheinungen, über die Kruse, Shiga und Lentz im Serum berichten, war nichts zu finden. Phagozytose, manchmal sehr hochgradig, fehlte zwar nie, aber der gröfste Teil der Bazillen war oft schon verschwunden, noch ehe die Zellen reichlich eingetreten waren. Es ist sehr wahrscheinlich, dafs die Dysenteriebazillen in kurzer Zeit förmlich ausgefällt wurden und sich an die Wand der Bauchhöhle und namentlich am Netze niederschlagen, wo Leukozyten sich ansammeln und als Phagozyten wirken. Das ist dann im aggressinimmunen Tiere der gleiche Verlauf, wie ich ihn in gemeinsamer Arbeit mit Herrn Dr. Weil[1]) bei intraperitonealer Injektion von Pseudodiphtheriebazillen, welche nicht imstande sind aggressiv zu wirken, beobachten konnte, so

1) Wiener klin. Wochenschr., 1905, Nr. 25.

dafs die Dysenteriebazillen im aggressinimmunen Tiere sich einfach wie reine Saprophyten verhalten. Ob dabei auch eine gewisse Bakteriolyse mitwirkt, ist mit Sicherheit nicht auszuschliefsen, Hauptsache ist sie jedenfalls nicht.

Eine Vermehrung der Bazillen, wie sie bei der Aggressinimmunität gegen Parasiten möglich ist, trat nicht ein, wo sie schliefslich, wie z. B. bei Meerschweinchen 215 erfolgte, war sie von Krankheit und Tod gefolgt. In der Tat bedeutet ja Vermehrung der Bazillen bei Dysenterie gleichzeitig Giftanhäufung, welcher die Immunität gewachsen sein müfste. Das rasche und reichliche Erscheinen der Leukozyten hat jedenfalls die Gift- und Aggressinbeseitigung zur Folge. In den erwähnten beiden Versuchen ist Giftmenge (zwei Agarkulturen) und Aggressinmenge (2,5 ccm Exsudat, vgl. den Infektionsverlauf beim Kontrolltiere) verhältnismäfsig eine ungeheuere, und dennoch hat die Immunität standgehalten. Aber dennoch ist die Giftparalysierung keine ganz vollständige gewesen. Denn abgesehen davon, dafs die Immuntiere infolge der Peritonitis am Versuchstage krank aussahen, folgte stets Abmagerung, die erst nach zwei und mehr Wochen wieder der vollständigen Wiederherstellung wich, ein Ereignis übrigens, das auch fast nach jedem Versuche mit grofsen Dosen von Typhus und Cholera mit dem entsprechenden bakteriolytischen Immunserum eintritt. Marasmus ist aber das Kennzeichen der chronisch gewordenen Vergiftung.

Wenngleich damit gezeigt ist, dafs die Giftbeseitigung nach aktiver Aggressinimmunisierung noch einiges zu wünschen übrig läfst, so kann doch das Ergebnis bei der Schwere der Infektion mit und ohne Aggressin als ein günstiges bezeichnet werden. Da die Vorbehandlung mit Aggressin mindestens für Meerschweinchen eine gänzlich ungefährliche ist, jedenfalls unschädlicher als die Injektion von Bazillen mit ihren schweren Reaktionen zur Erzeugung der bakteriziden Immunität[1]), so dürfte ein Versuch am Menschen für die nächste Zeit gerechtfertigt sein, wobei zu bedenken ist, dafs der Eintritt der

1) Vgl. Leutz, Handbuch von Kolle-Wassermann, Bd. 4, S. 900.

Aggressinimmunität ein relativ später ist (bei Meerschweinchen wenigstens 10, besser 14 Tage bis 3 Wochen), und dafs die behandelten Individuen bis zur Erlangung derselben im hohen Grade überempfindlich sind.

Kann so durch die bisherigen Versuche wenigstens das Prinzip der aktiven Aggressinimmunisierung als anwendbar und aussichtsreich bezeichnet werden, so ist die nächste Forderung nach Herstellung eines, womöglich zur Behandlung der menschlichen Krankheit geeigneten Immunserums viel schwerer zu erfüllen. Shiga[1]) wie Kruse[2]) gelang es, sehr hochwertige Sera durch vorsichtige Vorbehandlung verschiedener Tiere mit den Bazillen selbst zu gewinnen. Im bakterisiden Reagenzglasversuche erwiesen sich dieselben als bakterizide Immunsera, während im Tierkörper selbst eine typische Auflösung nur wenig beobachtet zu sein scheint.

Agglutination bewirken aber solche Sera sicher, und die Literatur über die Dysenteriebazillenagglutination im Blute von Kranken, Genesenen und immunisierten Tieren ist bereits eine sehr ansehnliche. Da aber erfahrungsgemäfs agglutinierende Bluteigenschaften nicht notwendig mit bakteriolytischen in Beziehung stehen müssen, läfst sich über die Natur der Wirkung der von verschiedenen Autoren (Shiga, Kruse, Lentz, Rosenthal) hergestellten und angewendeten Sera nichts sicheres aussagen, obwohl sie schon nach ihrer Entstehungsweise eine bakterizide zu sein scheint. Auch die Versuche an Menschen, die von Shiga, Kruse und Rosenthal mit Serum angestellt sind, geben über die Natur der Serumwirkung keine Anhaltspunkte, wenngleich die Resultate ermutigende sind.

Im wesentlichen gelten für die Gewinnung eines Immunserums für kranke oder in kürzester Zeit passiv zu immunisierende Menschen die gleichen Gesichtspunkte, wie sie oben für die aktive Immunität besprochen wurden. Aber ob nun das eventuell gewonnene Serum nur bakterizid oder nur antiaggressiv ist, seiner

1) Shiga, Deutsche mediz. Wochenschr., 1903, Nr. 18. Zeitschrift f. Hygiene, Bd. 41.

2) Kruse, Deutsche med. Wochenschr., 1901, Nr. 23, 24, 1903, Nr. 1 ff.

giftneutralisierenden Eigenschaft wird die gröfste Bedeutung zuerkannt werden müssen. Das geht bereits aus der Beobachtung der Bazillenwirkung im Tierversuche hervor: die imponierende und relativ rasche Vergiftung von Kaninchen, die langdauernde Abmagerung von Meerschweinchen nach Einführung von Bazillenmengen, die an sich noch gar nicht imstande sind, sich zu vermehren, wirken sehr überzeugend. Giftwirkungen, die sämtlich mit Sicherheit von den Leibessubstanzen der Bazillen hergeleitet werden können, sind ohne Intervention von lebenden Kulturen mehrfach beobachtet worden. Conradi[1]), sowie Neifser und Shiga[2]) gewannen Gifte aus Agarkulturen durch Autolyse und Extraktion, in Bouillonkulturen verschiedener Zusammensetzung wurden sie von Todd[3]), Rosenthal[4]) und Kraus[5]) und Dörr aufgefunden. Rosenthal, Todd und Kraus berichten auch in gelungenen Versuchen über Herstellung und Wirkungsweise antitoxischer Sera.

Wie bereits früher nachgewiesen, enthalten Exsudate dysenterischer Meerschweinchen neben Aggressin sehr wirksames Toxin, das aber natürlich je nach der Infektion, welcher die betreffenden Tiere erlagen, nach dem Zellgehalte der Flüssigkeit u. dgl. an Intensität wechseln mufs. Es ist kaum zu bezweifeln, dafs auch dieses Toxin als Endotoxin angesehen werden mufs, da in der Meerschweinchenbauchhöhle die Bazillenauflösung schneller und wohl auch ausgiebiger stattfindet als in der Bouillonkultur der erwähnten Autoren. Bekanntlich hat A. Wolf[6]) der Frage der Endotoxine und der Immunität besondere Aufmerksamkeit gewidmet und war dabei im wesentlichen zu dem Schlusse gelangt, dafs zur Erzeugung einer Anti-Endotoxinimmunität wenig günstige Aussichten vorhanden sind. Die Versuche mit Dysenteriebazillen beweisen, dafs dies für gewisse Mikroorganismen doch gelingt,

1) Conradi, Deutsche med. Wochenschr., 1903, Nr. 2.

2) Neifser und Shiga, Deutsche med. Wochenschr., 1903, Nr. 4.

3) Todd, zit. nach Leutz, a. a. O., S. 899. Journal of Hygiene, 1904, Bd. IV.

4) Rosenthal, Deutsche med. Wochenschr., 1903 u. 1904.

5) Kraus und Dörr, Wiener klin. Wochenschr., 1905, Nr. 7.

6) Wolf, Zentralbl. f. Bakteriol., 1904, Bd. XXXVII, S. 390 ff.

und auch jede Aggressinimmunität bei Dysenterie mufs schon ihrer Herkunft nach antitoxisch sein. Das ist ein sehr grofser Vorteil der durch Aggressineinspritzung gewonnenen Sera, die sich somit gegen die eigentliche Krankheitsursache, die Aggressivität der Bazillen, wie gegen das Moment richten, welches die Krankheitserscheinungen auslöst, das Gift.

Das Studium des Dysenteriegiftes im Meerschweinchenexsudate, dessen immunisatorische Wirkung, die Beeinflussung des Giftes durch das erzeugte Antitoxin, der Zusammenhang der dabei selbstverständlich stets zu beobachtenden Präzipitation auf die Giftbeseitigung und Antitoxinstärke[1]), bilden ebensoviele Probleme von grofser Wichtigkeit, deren Studium hauptsächlich wegen des öfter eintretenden Tiermangels noch nicht bewältigt werden konnte, und die deshalb vorbehalten sein mögen. Es wird ihr Ergebnis später mitgeteilt werden.

Jedenfalls gelingt die Herstellung antitoxischer Sera bei allen Tieren vermittelst aggressinhaltiger Exsudate sicher und verhältnismäfsig leicht, wobei allerdings niemals antitoxische Serumwirkungen von der Stärke etwa der Tetanussera beobachtet werden konnten. Keines der bisher erhaltenen Kaninchen- und Meerschweinchensera schützte bisher mit Leichtigkeit in der Menge von 0,1 ccm Kaninchen. Auch das Serum eines lange behandelten Schafes (s. unten) schützte nur in mäfsigem Grade.

Tabelle IV.

Serum von Kaninchen 14, nach 7 maliger Injektion von im ganzen 1,08 ccm Meerschweinchenaggressin binnen 3 Monaten. Als Toxin dient sterilisiertes Exsudat des dysenterischen Meerschweinchens 152.

Nr.	Serum	Toxin	Tod	Bemerkungen
67	2,0 ccm Immunserum subkutan	Nach 1 St. 0,1 ccm Toxin subkutan		Am Abend des 3. Tages wurde schwache Parese der Extremitäten beobachtet, die ohne stärker zu werden, 2 Tage lang bestand, dann völlig zurückging.

1) Dehne und Hamburger, Wiener klin. Wochenschr., 1904, Nr. 29, vgl. dazu die erst nach Fertigstellung dieser Versuche erschienenen Arbeiten von Sacharoff und Kraus und Pribram, beide Zentralbl. f. Bakteriol., Bd. 39, Heft 1.

Nr.	Serum	Toxin	Tod	Bemerkungen
68	0,5 ccm Immun-serum subkutan	wie 67	†	Wurde am Morgen des 4. Tages tot gefunden, ohne dafs Lähmung beobachtet worden wäre.
69	—	wie 67	†	Am 3. Tage typische Lähmung, die zunahm und am 4. Tage zum Tode führte.

Tabelle V.

Serum von Kaninchen 28 (s. Tab. VII) und Meerschweinchen 89 (s. Tab. VII). Als Toxin dient das sterile Exsudat des dysenterischen Meerschweinchens 180.

Nr.	Serum	Toxin	Tod	Bemerkungen
88	1,0 ccm Kaninchen-immun-serum i. v.	Nach 2 St. 0,1 ccm Toxin i. v.		Keinerlei Störung.
89	0,25 ccm des gleichen Serums i. v.	wie 88		Keinerlei Störung.
87	1,0 ccm normales Kaninchen-serum i. v.	wie 88	†	Am nächsten Tage bereits leichte Parese der Hinterfüfse und Vorderfüfse, die langsam bis zum Tode nach 3 Tagen, zunahm.
91	1,0 ccm Meerschw.-Immun-serum i. v.	wie 88		Keinerlei Störung.
92	0,25 ccm des gleichen Serums i. v.	wie 88	†	Nach 1 Woche wurde das Tier tot gefunden, ohne dafs Lähmung beobachtet wurde.
90	1,0 ccm Normal-Meerschw.-Serum i. v.	wie 88	†	Die Lähmung trat erst am 6. Tage ein, führte aber bereits am Morgen des nächsten Tages zum Tode.

Zu den Giftversuchen ist noch einiges zu bemerken. Sie werden natürlich am besten an Kaninchen angestellt, welche rasch eintretende und sehr charakteristische Erscheinungen[1]) darbieten. Meerschweinchen zeigen keine Lähmungen, wohl aber Marasmus, dessen Stärke vielleicht sehr von individuellen Verhältnissen abhängt. Es war nun sehr auffallend, dafs Meer-

1) Vgl. Archiv f. Hygiene, Bd. 52, S. 404.

schweinchen, die zur Prüfung der antiaggressiven Serumwirkung Bazillen in grofser Menge intraperitoneal erhalten hatten, auch nach vollständiger Beseitigung jeder Infektionsgefahr sehr oft abmagerten, manchmal auch nach Wochen steril an Kachexie zugrunde gingen. Überdies zeigten solche Tiere oft, trotz des nach einigen Stunden eintretenden günstigen Bazillen- und Zellbefundes in der Bauchhöhle, starke Krankheitserscheinungen, oft ausgeprägter als die Kontrolltiere, deren Bauchhöhle von Bazillen erfüllt war, und die kurze Zeit darauf starben. Gleichwohl war von Bazillenauflösung, wie etwa bei Cholera, nichts zu bemerken, und doch müssen diese Vergiftungserscheinungen auch auf die Bazillen bezogen werden. Gegen sie scheint das im Kaninchenversuche so deutlich die Lähmungen verhindernde antitoxische Serum nur sehr schlecht zu schützen. Auch bei Kaninchen wurde nach Serum-Exsudatinjektion mehrfach beobachtet, dafs die Tiere, ohne je die geringste Lähmung zu zeigen, nach Tagen oder Wochen eingingen, und zwar meist, ohne dafs Marasmus hohen Grades beobachtet worden wäre. Diese Verhältnisse, welche vielleicht auf eine Mehrheit von Giftwirkungen hindeuten, bedürfen noch sehr der Untersuchung, zu der die relativ leichte und einfache Gewinnung des Dysenterietoxins im Meerschweinchenexsudate günstige Bedingungen bieten dürfte.

In bezug auf die Wirkung von durch Aggressinimmunisierung gewonnenen Sera mögen zunächst einige Angaben folgen:

Tabelle VI.

Qualitativer Versuch mit Serum von Kaninchen 14 (s. Tab. IV).

Nr.	Serum	Infektion	Tod	Bemerkungen
156	2,5 ccm subkutan	Nach 6 Std. 1,5 ccm Exsudat eines dysenterischen Meerschw. i. perit.	lebt	Schon nach 1/2 Std. finden sich weder Bazillen noch Granula, wohl aber bereits kleine polynukleäre Leukozyten. Nach 1 Std. starke Vermehrung von kleinen polynukleären Zellen. Nach 2 Std. treten auch grofse polynukleäre Leukozyten in dem eitrigen Exsudate auf. Nach 3 Std. reiner Eiter. Lebt.
157	—	wie 156	ca. 16 Std.	Fortschreitende Vermehrung der Bazillen, aber doch nur Sektionsbefund einer mittelschweren Infektion.

Tabelle VII.

Serum von Meerschweinchen 89, das innerhalb 3 Monate 7,3 ccm Meerschweinchenaggressin erhalten hatte und von Kaninchen 28, das in der gleichen Zeit mit 0,95 ccm behandelt worden war.

Nr.	Serum	Infektion	Tod	Bemerkungen
178	1,0 ccm Meerschwein.-Immunserum subkutan	Nach 15 Std. $1^1/_4$ Agarkultur i. perit.	lebt	Nach $^1/_2$ Stunde sind bereits sehr viele Leukozyten, aber keine Bazillen mehr zu finden. Einige zweifelhafte Granula wurden beobachtet. Weiterhin wurde das Exsudat rasch eitrig, ohne dafs noch Bazillen zu sehen waren.
179	1,0 ccm Kaninchen-Immunserum subkutan	wie 178	lebt	Nach $^1/_2$ Std. grofse Mengen von Bazillen, wenig Leukozyten. Nach 1 Std. noch viele Bazillen, aber weniger als im Kontrolltiere; hie und da Zusammenballung derselben, meist um Leukozyten herum. Nach 2 Std. vermehren sich die Leukozyten unter langsamer Bazillenabnahme. Nach 3 Std Leukozyten vermehren sich weiter, die Zahl der Bazillen stark in Abnahme, doch finden sich noch Haufen von Zellen herum. Starke Phagozytose. Nach 7 Std. sind in dem eitrigen Exsudate weder Bazillen, noch Granula, noch Phagozytose zu finden.
180	—	wie 178	innerhalb 20 Std.	Progressive Bazillenvermehrung. Nach 2 Std. sind einige Leukozyten vorhanden, die auch Phagozytose zeigen, sich aber nicht vermehren. Befund der schwersten Infektion.

Alle Autoren, die sich mit Dysenterieimmunisierung beschäftigen, betonen die Schwierigkeit der Immunisierung von Kaninchen mit Bazillen, während die Behandlung mit Aggressin bei einiger Vorsicht eine sehr leichte ist. Man mufs natürlich nur Sorge tragen, die erste Injektion wegen der grofsen Giftigkeit der Exsudate sehr klein zu machen (0,005—0,01 ccm). Üble Zufälle wurden bei vorsichtiger Steigerung nicht beobachtet, Gewichtsabnahmen gleichen sich schnell wieder aus.

Grofse Sorgfalt wurde auf die Behandlung eines Schafes mit Dysenterieaggressin verwendet, um zu sehen, ob sich in grofsen Mengen wirksames Serum gewinnen liefse. Im ganzen ist der Erfolg der fast achtmonatlichen Bemühungen an diesem Tier ein mäfsiger, wenngleich er im Prinzip vollständig den gehegten

Erwartungen entspricht und dieselben bestätigt. Dafs nicht bessere Resultate erzielt wurden, liegt vielleicht an der unzweckmäfsigen Wahl der Tierart. Mit Pferden (Shiga, Kruse), wohl auch mit Ziegen (Lentz), dürften nach den bisherigen Erfahrungen die Versuche leichter sein.

Das Schaf war zuerst mit geringen Dosen sterilen Meerschweinchenaggressins, die gut vertragen wurden, subkutan behandelt worden. Als die Dose höher wurde, stellte sich starke lokale Reaktion in Gestalt von lange bestehenden Infiltraten ein, auch das Allgemeinbefinden war gestört. Nach jeder Injektion wurde eine grofse Pause eintreten gelassen, schon deshalb, weil die Erfahrung bei allen Aggressinimmunisierungen gelehrt hat, dafs die allzufrühe Entnahme von Blut leicht ein Serum liefert, das statt zu schützen, die Infektion begünstigt, also aggressiv ist, genau so wie bei aktiver Immunisierung eine gewisse, nicht zu kurze Zeit verstreichen mufs, damit die Infektion nicht ein überempfindliches Tier betreffe. Bei der subkutanen Injektion des Aggressins mufs darauf geachtet werden, dafs dieselbe im lokalen Zellgewebe ausgeführt wird, wonach die entstehenden Infiltrate nach kurzer Zeit zum grofsen Teil verschwinden, während sie sonst sehr langsam resorbiert werden.

Nachdem das Tier im ganzen 17,5 ccm Aggressin in sieben Injektionen erhalten hatte, wurde das Serum geprüft und zwar mit sehr schlechtem Erfolge.

Tabelle VIII.

Schafserum nach Injektion von im ganzen 17,51 ccm Meerschweinchenaggressins innerhalb ca. $2^1/_2$ Monaten. Antiaggressive Wirkung.

Nr.	Serum	Infektion	Tod	Bemerkungen
137	2,0 ccm Immunserum subk.	Nach 16 Std. 2 ccm Exsudat eines dysenterischen Meerschw. i. perit.	in der Nacht	Ohne Unterschied. Verlauf und Befund schwerster Infektion.
138	2,0 ccm Normal-Schafserum subk.	wie 137	in der Nacht	

Tabelle IX.

Das gleiche Schafserum wie oben in Tabelle VIII. Antitoxische Wirkung an Kaninchen von ca. 1000 g.

Nr.	Serum	Toxin	Tod	Bemerkungen
54	2,0 ccm Normal-Schafserum subk.	Nach 1 Std. 0,1 ccm subkut.	5 Tage	Lähmung trat erst am Morgen des 4. Tages ein und wurde rasch vollständig.
55	2,0 ccm Immunserum subk.	wie 54	lebt	Dauernd gesund geblieben.
56	0,5 ccm Immunserum subk.	wie 54	4 Tage	Am 3. Tage bereits Lähmung, die langsam zunahm.

Darnach erhielt das Schaf auf einmal 8,0 ccm Meerschweinchenaggressin subkutan und nach Verlauf von 3 Wochen wurde neuerlich Serum genommen.

Tabelle X.

Nr.	Serum	Infektion	Tod	Bemerkungen
163	1,5 ccm Immunserum subkutan	Nach 15 Std. 2 Agarkulturen i. perit.	in der Nacht	Der einzige Unterschied gegen das Kontrolltier bestand in dem reichlichen Auftreten von Leukozyten während der Infektion und dem Befunde eitriger Auflagerungen bei der Sektion. Die Bazillenvermehrung war nicht beeinflufst.
164	ohne Serum	wie 163	in der Nacht	

Infolge dieses ungünstigen Ergebnisses wurde die intravenöse Injektion (8,0 ccm Meerschweinchenaggressins in zwei Injektionen) versucht. Darnach war das Serum deutlich wirksam.

Tabelle XI.

Nr.	Serum	Infektion	Tod	Bemerkungen
183	2,0 ccm Immunserum subkutan	Nach ca. 20 Std. 1 Agarkultur i. perit.	lebt	Nach 1 Std. waren Leukozyten bereits aufgetreten, daneben Bazillen. Nach 2 Std. noch reichliche Bazillen. Schwache Phagozytose. Nach 3 Std. sind die Bazillen viel spärlicher geworden, daneben Eiter mit Makrophagen, grofsen und kleinen polynukleären Leukozyten. Nach 6 Std. Eiter fast ohne freie Bazillen mit schwacher Phagozytose.

Nr.	Serum	Infektion	Tod	Bemerkungen
184	0,5 ccm Immunserum subkutan	wie 183	lebt	Bereits nach 1/2 Std. ansehnliche Zahl von Leukozyten. Bazillen schon vermindert, nehmen aber dann wieder zu. Nach 3 Std. ist der Unterschied gegen das Kontrolltier gering. Nach 6 Std. sind die Bazillen stark vermindert und massenhaft Leukozyten mit mäfsiger Phagozytose sind aufgetreten. Das Tier war krank, erholte sich dann aber wieder.
185	—	wie 183	ca. 20 Std.	Beständig fortschreitende Bazillenvermehrung und Befund der schweren Infektion.

Nach einer weiteren intravenösen Injektion von 7,0 ccm Meerschweinchenaggressins und einmonatlicher Pause ergab die Serumprüfung bei gleichzeitiger intraperitonealer Impfung:

Tabelle XII.

Nr.	Infektion	Tod	Bemerkungen
201	1,0 ccm Exsudat eines dysenterischen Meerschweinchens + 0,75 ccm Immunserum i. perit.	lebt	Nach 1/4 Std. relativ spärliche Bazillen, zum Teil in Haufen. Spärliche Leukozyten. Nach 1/2 Std. wenige Bazillen, keine Granula. Nach 1 Std. viele Leukozyten mit schwacher Phagozytose. Spärliche Bazillen, hie und da Granula. Nach 2 Std. im wesentlichen gleich. Nach 3 Std. massenhaft Leukozyten, von denen die grofsen polynukleären Phagozytose zeigen. Weder Bazillen noch Granula.
202	1,0 ccm Exsudat + 0,25 ccm Immunserum i. perit.	nach 24 Std.	Nach 1/4 Std. sind die Bazillen zu grofsen und kleinen Haufen zusammengeballt. Nach 1/2 Stunde ungefähr ebenso, aber unter Bazillenverminderung. Nach 1 Std. sind erst wenig Leukozyten bei gleichem Bazillenbefunde aufgetreten, ebenso nach 2 Std. Nach 3 Std. nehmen die Leukozyten unter energischer Phagozytose zu, aber auch die Bazillen. Die Sektion ergibt wenig dickes eitriges Exsudat mit grofsen und kleinen polynukleären Leukozyten und starker Phagozytose, daneben viele freie Bazillen. Viele Auflagerungen.
203	Kontrolle ohne Serum	in der Nacht	Progressive ununterbrochene Bazillenvermehrung, ohne Leukozytenzutritt; schwerste Infektion.

Ein Vergleich der Wirkung von Kruses Serum und dem erwähnten Schafserum unter schwerster Infektion zeigt:

Tabelle XIII.

Nr.	Serum	Infektion	Tod	Bemerkungen
204	0,5 ccm Kruses Serum	Gleich danach 1,5 ccm Exsudat von Nr. 203	lebt	Nach $^1/_4$ Std. sind nur noch wenige Bazillen mit viel Granulabildung vorhanden, keine Haufenbildung, keine Zellen. Nach 1 Std. ebenso. Nach 2 Std. wenige Granula und Bazillen, keine Zellen. Nach 3 Std. weder Bazillen noch Granula, fast keine Zellen. Erst nach 8 Std. finden sich reichliche Leukozyten, einige zeigen Phagozytose. Bleibt am Leben.
205	0,5 ccm Schafserum	wie 204		Nach $^1/_4$ Std. sind sämtliche Bazillen zu Haufen vereint. Es finden sich bereits ansehnliche Mengen von kleinen polynukleären Zellen mit intensiver Phagozytose. Nach $^1/_2$ Std. wie vorher, aber Verminderung der Bazillen. Nach 1 Std. ist die Zahl der Bazillen weiter gesunken. Die Haufen sind klein, die Phagozytose wird schwächer. Nach 2 Std weitere Bazillenverminderung und Leukozytenvermehrung. Nach 3 Std. sind nur noch einige kleine Haufen mit Mühe zu finden. Nach 8 Std. reiner Eiter ohne Bazillen und Granula. Bleibt am Leben.

Beide Sera hätten also in der Menge von 0,5 ccm schützen können; die Verschiedenheit der Wirkungsweise, das Fehlen der Agglutination und das spätere Eintreten der Leukozytose in Versuchen mit Kruses Serum tritt deutlich hervor.

Trotz der auffallend gesteigerten Wirkung mufste die intravenöse Injektion des Aggressins wieder aufgegeben werden, da dieselbe nur mit sichtlicher Lebensgefahr auszuführen war. Bald nach der Injektion wurde das Schaf krank, die Atmung frequent und dann röchelnd, kurz, das Tier bot die Symptome eines akutesten Lungenödems. Dann erfolgte die Erholung sehr rasch, das Tier war am nächsten Tage wieder gesund und zeigte auch nur kurze Zeit hindurch Gewichtsabnahme. Ob diese bedrohlichen Erscheinungen auf das Toxin des Exsudates zurückzuführen sind, oder einfach auf die artfremde Flüssigkeit[1]), ist nicht entschieden, doch ist letzteres wahrscheinlicher.

1) Vgl. »Die Serumkrankheit« von v. Pirquet und Schick.

Es wurde dann noch Aggressin in grofsen Dosen je 10 und 20 ccm auf einmal in das lockere Gewebe der Schenkelfalte injiziert, wonach die Infiltrationen rasch zurückgingen. Wesentlich stärker war aber darnach die schützende Serumwirkung nicht geworden.

Tabelle XIV.

Nr.	Serum	Infektion	Tod	Bemerkungen
218	0,5 ccm Serum	$1^1/_2$ Agarkultur	lebt	Nach 10 Min. findet sich starke Haufenbildung der injizierten Bazillen, meist um polynukleäre Leukozyten herum. Nach $^1/_2$ Std. auffallende Abnahme der Bazillen, ohne Granulabildung. Gleichzeitig sind auch die Leukozyten fast verschwunden. Nach 1 Std. nehmen die Leukozyten wieder etwas zu, die Bazillen sind weniger geworden, hie und da findet sich unsichere, vereinzelte Granulabildung. Nach 2 Std. haben sich die Bazillen gegen früher etwas, aber immer unter Haufenbildung, vermehrt. Gleichzeitig treten reichlich kleine, weniger grofse polynukleäre Leukozyten auf mit energischer Phagozytose. Nach 3 Std. Abnahme der Bazillen, sonst wie vorher. Nach 7 Std. sind noch immer Bazillen in ungefähr gleicher Zahl, vorher neben massenhaft Leukozyten zu finden; die Phagozytose hat an Intensität nachgelassen. Das Tier war noch am nächsten Morgen krank und wurde sehr marastisch.
219	0,1 ccm Serum	$1^1/_2$ Agarkultur	in der Nacht	Nach 10 Min. bilden viele Bazillen um kleine polynukleäre Leukozyten kleine Häufchen. Nach $^1/_2$ Std. ist die Haufenbildung der Bazillen sehr ausgesprochen. Zellen wie vorher. Nach 1 Std. haben sich die Bazillen unter stärkster Haufenbildung etwas vermindert. Zellen nicht auffällig vermehrt. Nach 2 Std. ist die Haufenbildung gröfstenteils verschwunden, die Zahl der Bazillen hat sich vergröfsert, aber auch die der Zellen, welche stärkste Phagozytose zeigen. Nach 3 Std. sind die Bazillen vermindert, die Leukozyten aber nur wenig vermehrt. Nach 7 Std. neben vielen, meist kleinen polynukleären Leukozyten mit schwacher Phagozytose wieder sehr zahlreich freie Bazillen vorhanden. Im toten Tiere findet sich eine starke Verunreinigung durch grofse dicke Stäbchen.

Nr.	Serum	Infektion	Tod	Bemerkungen
220	Kontrolle	$1^1/_2$ Agarkultur	in der Nacht	Die Bazillen vermehren sich ohne jede Haufenbildung ununterbrochen. Leukozyten treten während der ganzen Beobachtung nur in sehr geringer Zahl in die Bauchhöhle ein. Die Sektion ergibt den Befund schwerster Infektion.
221	0.5 ccm Serum i. perit.	gleich darauf 0,75 ccm frisches Exsudat von 220 i. perit.	nach 5 Tag.	Nach $^1/_4$ Std. ist starke Haufenbildung bei Anwesenheit weniger Leukozyten zu beobachten. Nach $^1/_2$ Std. sind die Bazillen fast verschwunden. Nach 1 Std. ebenso, es treten einige polynukleäre Zellen mit schwacher Phagozytose auf. Nach 3 Std. sind noch spärliche Bazillen, neben massenhaften Zellen mit schwacher Phagozytose zu finden. Das Tier wurde schwer krank, erholte sich dann, ging aber nach 5 Tagen marastisch ohne Bazillen zugrunde.
222	Kontrolle ohne Serum	wie 221	in der Nacht	Fortschreitende Vermehrung der Bazillen, ohne Leukozytenübertritt, schwerste Infektion.
223	0,4 ccm Serum	gleich darauf 0,5 ccm frisches Exsudat von 222	nach 32 Std.	Nach $^1/_2$ Stunde schöne Haufenbildung der Bazillen, wenig Leukozyten. Nach 1 Std. vermindern sich die Bazillen sehr stark. Nach 2 Std. treten massenhaft Leukozyten mit Phagozytose in die Bauchhöhle über ohne sichtliche Veränderung der Zahl der freien Bazillen. Die Bazillenzahl bleibt im wesentlichen trotz Eiters in der Bauchhöhle gleich bis nach 8 Std., wo wieder Vermehrung eintritt. Die Sektion ergab ein dick eitriges Exsudat mit vielen Auflagerungen auf Leber, Milz und Netz. Leukozyten mit starker Phagozytose, daneben reichliche freie Bazillen.
224	0,1 ccm Serum	wie 223	nach 24 Std.	Nach $^1/_2$ Std. finden sich nur wenig Andeutungen von Haufenbildung in der ungeheuren Menge der Bazillen. Keine Leukozyten. Nach 1 Std. wie vorher. Nach 2 Std. treten Leukozyten auf, aber viel weniger zahlreich als bei 223. Das Bild bleibt unter beständiger Zunahme der Bazillen und langsamer Abnahme der Leukozyten so bis zum nächsten Morgen. Die Sektion ergibt ein dickes eitriges Exsudat mit massenhaft Bazillen und sehr vielen polynukleären Zellen mit intensiver Phagozytose. Reichliche eitrige Auflagerungen.
225	Kontrolle ohne Serum	wie 223	nach $8^1/_2$ St.	Fortschreitende Bazillenvermehrung ohne Leukozytenzutritt. Befund der schwersten Infektion.

Die Schutzkraft des Schafserums kann also bei der gewählten Infektionsart gegenwärtig mit 0,5 ccm für ein Meerschweinchen von 200–300 g angenommen werden. Das scheint auf den ersten Blick sehr wenig im Vergleiche z. B. mit den Kruseschen Seris, die in kleinen Bruchteilen eines Milligramms noch schützten. Das Ergebnis wird aber ein anderes, wenn man die Infektionsart berücksichtigt, die gewählt wurde und gewählt werden mufste, um Infektion und Gift, oder auch Infektion, Aggressin und Gift gleichzeitig zur Wirkung zu bringen. Leider war es wegen empfindlichen Tiermangels nicht möglich, das Serum, welches Herr Prof Kruse in liebenswürdigster und dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt hatte, im Meerschweinchenversuch ausführlich vergleichend zu prüfen, wie es für Agglutination und Bakteriolyse in vitro geschehen konnte.

Was den Schützwert des Schafserums gegen Toxinwirkung beim Kaninchen betrifft, so wurde derselbe nur qualitativ geprüft; 0,5 ccm Schafserum schützte vollständig gegen 0,25 ccm Toxin (mindestens fünffach tödliche Dosis), beides subkutan und örtlich und zeitlich getrennt (das Antitoxin 8 Stunden vorher) angewendet.

Bei der Durchsicht der bei Zuführung der Wirkung des Schafserums ausführlich wiedergegebenen Versuche fällt sofort in Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei der aktiven Aggressinimmunisierung das rasche und reichliche Zuströmen der Leukozyten auf, dem wohl hier dieselbe Bedeutung wie dort beigelegt werden mufs. Es findet auch dann noch statt, wenn, wie bei Nr. 224, beständig grofse Mengen von sich vermehrenden Bazillen in der Bauchhöhle sind, und liefert das Sektionsbild der relativ leichten Infektion, wo die Bauchhöhle des Kontrolltieres fast leukozytenfrei bleibt.

In den Fällen, wo der Schutz deutlich ausgesprochen ist, erfolgt aber auch mehr oder minder rasche Abnahme der in grofser Menge eingespritzten Bakterien. Von einer sicheren Auflösung, Quellung und Körnchenbildung war nur selten eine Spur zu bemerken, obwohl sie nach den Versuchen von Lentz[1]) in der Meerschweinchenbauchhöhle gut beobachtet werden kann.

1) Lentz, Handbuch von Kolle und Wassermann, Bd. 4, S. 898.

Im Reagenzglasversuche fehlte jede Bedeutung von Immunkörperwirkung so vollständig, dafs Zusatz des inaktivierten Serums sogar eine Verschlechterung der als Komplement benutzten Kaninchenseris herbeiführte.

Tabelle XV.

Schafserum, wie das in Tabelle XII mit Meerschweinchen 201, 202 benutzte.

		Sofort	Nach 4 St.
1.	0,1 inakt. Schafserum + 0,3 akt. Kanin.-Serum + 0,6 Na Cl	88	einige Tausend
2.	0,05 » » + 0,3 » » + 0 65 »	88	einige Tausend
3.	0,01 » » + 0,3 » » + 0,69 »	88	einige Tausend
4.	0,001 » » + 0,3 » » + 0,69 »	88	einige Tausend
5.	0,3 » » + 0,7 »	88	0
6.	1 »		104

Tabelle XVI.

Schafserum, wie das in Tabelle XII mit Meerschweinchen 201, 202 benutzte.

		Sofort	Nach 4 St.
1.	0,1 inakt. Schafserum + 0,3 akt. Kanin.-Serum + 0,6 Na Cl	ca. 30 000	∞
2.	0,05 » » + 0,3 » » + 0,65 »	ca. 30 000	∞
3.	0,01 » » + 0,3 » » + 0,69 »	ca. 30 000	∞
4.	0,1 Kruse-Serum + 0,3 » » + 0,6 »	ca. 30 000	ca. 10 000
5.	0,05 » + 0,3 » » + 0,65 »	ca. 30 000	ca. 10 000
6.	0,01 » + 0,3 » » + 0,69 »	ca. 30 000	ca. 10 000
7.	0,3 » » + 0,7 »	ca. 30 000	ca. 10 000

Sehr auffällig trat auch die Wirkung des Kruseschen Serums (dasselbe war ungefähr zwei Jahre alt) nicht hervor, doch bestand immerhin ein sehr deutlicher Unterschied gegen das Schafserum. Die benutzte Kultur war die wenig virulente Krusesche Stammkultur.

Während der Mangel von sichtbar zu machenden, bakteriziden Eigenschaften nicht auffallend war, kam die Ausbildung hoher agglutinierender Fähigkeiten im Tierkörper selbst überraschend, um so mehr als das Serum im Glase nur wenig agglutinierte. Schon bei aktiv immunisierten, weit schöner aber bei Serumtieren trat diese Eigentümlichkeit schon ganz kurze Zeit nach der Bazilleneinführung auf. Die Haufen, die sich bildeten, waren oft sehr grofs und unterschieden sich einigermafsen von denen, wie sie aufserhalb des Tierkörpers durch z. B. das

Krusesche Serum erzeugt wurden. Sie waren nämlich aufserordentlich dicht und machten einen sehr kompakten Eindruck. In sehr vielen Fällen gaben Leukozyten, die meist mit Bazillen erfüllt waren, den Kern der Haufen ab, in anderen waren die Leukozyten nur noch undeutlich zu sehen, öfters fehlten sie ganz. Wie die oben mitgeteilten Versuchsauszüge erkennen lassen, konnte auf die Haufenbildung vollständiges Verschwinden, aber auch wieder Auseinandergehen der Bazillen und Vermehrung erfolgen. Auch Bail[1]) hatte bei Typhusaggressinimmunität Bazillenagglutination in der Bauchhöhle von Meerschweinchen beobachtet, während aber seine Sera dabei auch aufserhalb der Tierkörper agglutinierten, erwies sich das in dieser Richtung wiederholt und sehr genau untersuchte Schafserum als dauernd sehr wenig wirksam.

Tabelle XVII.

Schafserum wie in den Versuchen mit Meerschweinchen 201, 202, 203 in Tabelle XII. Agglutination 2 Stunden bei 37° C.

Verdünnung	Kruses Serum	Schafserum
1 : 50	Komplett, klar geworden, mit Satz	Keine Agglutination.
1 : 100		
1 : 500		
1 : 1000		
1 : 2000		
1 : 5000	Deutlich, aber unvollständig	

Tabelle XVIII.

Die gleiche Sera wie in Tabelle XVII, 3 Tage später untersucht. Agglutinationsprüfung nach Weil bei 55° C. Das Ergebnis ist nach halbstündiger Beobachtung bei dieser Temperatur notiert. Auch später trat keine Veränderung ein.

Verdünnung	Kruses Serum	Schafserum
1 : 50	Komplett	Schwache Haufenbildung.
1 : 100		Undeutl. Beginn ohne Fortschreiten
1 : 500		Keine Agglutination.
1 : 1000		
1 : 5000	Deutlich	

Tierische Bazillen aus dem Exsudate infizierter Tiere unterliegen der Agglutination durch das Krusesche Serum etwas

1) Wiener klin. Wochenschr., 1905, Nr. 17.

schwächer als Kulturbazillen, ein Ergebnis, das mit Rücksicht auf die Verhältnisse bei Typhus nicht ohne Bedeutung ist, das Schafserum agglutinierte dieselbe überhaupt nicht.

Tabelle XIX.

Gewaschene Bazillen aus dem Exsudate eines der intraperitonealen Infektion erlegenen Meerschweinchens. Anordnung wie in der vorigen Tabelle; 4 Tage später angestellter Versuch.

Verdünnung	Kruses Serum	Schafserum
1 : 50	Komplett	Keine Agglutination.
1 : 100	Komplett	Keine Agglutination.
1 : 500	Komplett	Keine Agglutination.
1 : 1000	Schwache Agglutination	Keine Agglutination.
1 : 5000	Keine Agglutination	Keine Agglutination.

Erst die letzte der bisher untersuchten Serumproben des Schafes liefs eine deutliche Agglutination bei 55° bis zur Verdünnung 1 : 100 erkennen.

Tabelle XX.

Schafserum wie das in Tabelle XIV, für die Meerschweinchen von 218 ff. benutzt. Agglutination bei 55°.

Verdünnung	Kruses Serum	Schafserum
1 : 50	Nach 10 Min. komplette Agglutination	Nach 10 Min. beginnende, nach ½ Std. komplette
1 : 100	Nach 10 Min. komplette Agglutination	Nach 10 Min. keine, nach ½ St. komplette
1 : 500	Nach 10 Min. komplette Agglutination	Auch nach 4 Std. keine Agglutination
1 : 1000	Nach ½ Std. noch nicht deutlich, erst nach 4 Std. komplett	Auch nach 4 Std. keine Agglutination
1 : 5000	Nach ½ Std. noch nicht deutlich, erst nach 4 Std. komplett	Auch nach 4 Std. keine Agglutination

Bessere Resultate in bezug auf Agglutination aufserhalb des Tierkörpers lieferten Aggressinimmunisierungen an Kaninchen und Meerschweinchen, doch waren auch hier die erzielten Werte nicht bedeutend.

Tabelle XXI.

Serum von Kaninchen 28 und Meerschweinchen 89 (s. Tab. VII). Agglutinationsversuch bei 55°.

Verdünnung	Kaninchenserum	Meerschweinchenserum
1 : 50	Nach ½ Std. keine, nach 1 Std. unvollständig	Nach ½ Std. keine
1 : 100	Keine Agglutination	Nach 1 Std. ziemlich komplette
1 : 500	Keine Agglutination	Keine Agglutination

Dieses eigentümliche Verhalten des Serums, das auch nach seiner subkutanen Anwendung nach Bazilleninjektion in die

Bauchhöhle auftrat, aufserhalb des Tieres aber bereits in relativ starker Konzentration fehlte, aufzuklären, gelang nicht. Es erinnert sofort an Versuche von Bail[1]) bei Typhus in der Meerschweinchenbauchhöhle, wo eine getrennte Entstehung der haptophoren Agglutiningruppe (des Agglutinophors) und der toxophoren (des Hemiagglutinins) wahrscheinlich gemacht werden konnte.

Es sieht so aus, als ob dem Aggressinserum einer dieser beiden Bestandteile fehlte und erst im Tiere selbst dazutreten würde. Versuche aufserhalb des Tierkörpers, die »Ergänzung« der fehlenden Bestandteile vorzunehmen, hatten bisher keinen sicheren Erfolg. Da es aber in neuerer Zeit immer wahrscheinlicher wird, dafs die Agglutination im wesentlichen auf physikalische Zustandsänderungen in den Suspensierungsflüssigkeiten beruht, wird wohl auch eine andere Erklärung gesucht werden müssen.

Der unmittelbare Eindruck aber, den man bei Verfolgung dieser merkwürdigen Haufenbildung über ihren Zweck erhält, geht dahin, dafs es darauf ankommt, die Bazillen aus der freien Bauchhöhle zu entfernen und sie am Netze u. dgl. niederzuschlagen, also in den unmittelbaren Wirkungsbereich der hier besonders reichlich auftretenden grofsen polynukleären Leukozyten und den Makrophagen zu bringen. Das müfste natürlich durch die Haufenbildung sehr erleichtert werden.

Bei der in kurzer Zeit stattfindenden Bakteriolyse z. B. von Choleravibrionen unter dem Einflusse hochwertiger Sera, kann das gar nicht erfolgen, der Mechanismus ist ein ganz anderer. Sowie das Stadium der Aggressinimmunität bei Typhus und hier bei Dysenterie zum ersten Male eine Haufenbildung in grofsem Mafsstabe im Tierkörper hat auffinden lassen, würde sie jetzt auch, teleologisch gesprochen, einen Zweck der sonst ganz unverständlichen Agglutination zu erkennen geben.

In kurzer Zusammenfassung lieferte die Untersuchung über Aggressinimmunität bei Dysenterie bisher folgende Ergebnisse:

1. Es gelingt Meerschweinchen gegen schwere und schwerste intraperitoneale Infektion mit Dysenteriebazillen durch

1) Archiv f. Hygiene, Bd. 42, S. 307.

zweimalige Infektion sterilen aggressiven Meerschweinchenexsudats aktiv zu immunisieren.

2. Kaninchen können durch ähnliche, entsprechend kleinere Injektionen gegen das Dysenterietoxin immunisiert werden.
3. Nach langer Vorbehandlung mit solchen Exsudaten liefern Meerschweinchen, Kaninchen und Schafe ein Serum, welches in Mengen von etwa 0,5 ccm Meerschweinchen von intraperitonealer Infektion, Kaninchen vor Vergiftung zu schützen vermag.
4. In der Bauchhöhle aktiv und passiv immunisierter Meerschweinchen findet eine eigentümliche und starke Haufenbildung der injizierten Dysenteriebazillen statt, obwohl die agglutinierenden Eigenschaften des Serums in vitro nur sehr wenig ausgeprägte sind.
5. Das durch Aggressinbehandlung gewonnene Immunserum zeigt in vitro nicht die bekannten Eigenschaften eines bakteriolytischen Serums, im aktiv und passiv immunisierten Meerschweinchen lassen sich, wenn überhaupt, nur Spuren einer Bakteriolyse auffinden.
6. Die hier studierte Immunitätsform mufs daher, abgesehen von ihrer antitoxischen Komponente, als eine neuartige, antiaggressive bezeichnet werden.

Zum Schlusse meines Aufenthaltes in Europa ist es mir Bedürfnis, Herrn Prof. Hueppe für die gewährte Arbeitsmöglichkeit und das beständige Interesse an meiner Arbeit und Herrn Prof. Bail für die tatkräftige Unterstützung bei der Ausführung derselben meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Über Bleivergiftungen durch eine Wasserleitung.

Von

Inspektor Dr. **Paul Fortner**.

(Aus der k. k. allg. Untersuchungsanstalt für Lebensmittel der deutschen Universität in Prag. Vorstand: Prof. Hueppe.)

In den folgenden Zeilen soll über eine Bleivergiftung berichtet werden, für deren Entstehung anfänglich unter Berücksichtigung der in der diesbezüglichen Literatur niedergelegten Erfahrungen unter Vorbehalt eine Erklärung gegeben wurde, welche namentlich auch im Hinblicke auf das vorliegende Protokoll nahe lag, sich aber, wie spätere Versuche zeigten, nicht aufrecht erhalten liefs. Es scheint vielmehr im vorliegenden Falle ein einziger Faktor mafsgebend gewesen zu sein, die Bleilösung zu bewirken bzw. zu fördern. Allerdings wirkte entschieden begünstigend die Länge der Bleiröhrenleitung.

Der Sachverhalt war folgender:

In einem isoliert stehenden, einer Betriebsunternehmung gehörigen Gebäude, in welchem nur Arbeiterwohnungen untergebracht waren, erkrankten im Dezember 1903 neun Inwohner unter Symptomen von Bleivergiftung. Stuhlverstopfung, krampfartiges Zusammenziehen im Leibe, namentlich um die Nabelgegend, schiefergrauer oder blauschwarzer Saum am Zahnfleische,

allgemeine Blässe, Appetitlosigkeit, übler Geschmack im Munde und Erbrechen deuteten mit gröfster Wahrscheinlichkeit auf schwere Bleivergiftungen. Die ganze Sachlage liefs gleichzeitig einen gemeinsamen Herd vermuten, als welcher das von allen Bewohnern in gleicher Weise genossene Trinkwasser angesehen wurde. Eine an Ort und Stelle von den hierzu berufenen Sanitätsorganen vorgenommene vorläufige Prüfung ergab die Anwesenheit von Blei, Salpetersäure und salpetriger Säure in dem Wasser. Es wurden nun der Leitung zwei Liter Wasser entnommen und dieselbe sodann gesperrt. Aufser diesen zwei Litern Wasser wurden noch weitere zwei Liter Wasser aus jenem Teil der Leitung entnommen, welcher sich vor dem Anschlufs des Bleirohres befand.

Die Leitung ist, wie das Protokoll anführt, eine seit 1896 bestehende Hochquellenleitung, von welcher ein Strang bis zu einem der obenerwähnten Betriebsunternehmung gehörigen Kohlenschachte führt. Von diesem Schachte aus liefs die Betriebsunternehmung einen Bleirohrstrang bis zu dem Gebäude legen, in welchem die Erkrankungen beobachtet worden waren. Diese Bleirohrleitung lag etwa 1,3—1,5 m tief knapp unter dem Kanalgraben, welcher die heifsen Kondenswässer des Schachtes führt und stark durchlässig sein soll, und passierte endlich im Hofe des Gebäudes die Nähe einer vollständig undichten Senkgrube, deren umgebendes Terrain mit Senkgrubeninhalt durchsetzt sein soll. Die ganze Bleirohrleitung ist 680 m lang und war seit August 1903 in Betrieb. Die ersten Erkrankungen waren im Oktober beobachtet worden und zur Zeit der Untersuchung waren von den 27 in dem Hause wohnenden Leuten 17, d. i. 63%, teils leichter, teils schwerer erkrankt und 2, d. i. 7,4%, gestorben. Die der Bleiintoxikation Erlegenen waren zwei Kinder im Alter von 2 Jahren, bzw. 9 Monaten. Bemerkt sei noch, dafs die Zweigleitung am tiefsten Punkte der Hauptleitung angeschlossen war, und dafs sich häufig Druckunregelmäfsigkeiten einstellten.

Die chemische Analyse der beiden eingesendeten Wasserproben ergab folgendes Resultat (mit I ist das vor Anschlufs des

Bleirohres entnommene Wasser, mit II jenes aus der Bleirohrleitung bezeichnet):

	Milligramm im Liter I.	Milligramm im Liter II.
Gesamtrückstand bei 100° C . . .	105,0	120,8
Kalk	14,4	14,8
Magnesia	7,7	7,3
Eisenoxyd + Tonerde	0,4	0,8
Ammoniak	0	0
Chlor	8,4	8,0
Salpetrige Säure	0	starke Reakt.
Salpetersäure	Spur	Spur
Schwefelsäure	24,4	21,3
Schwefelwasserstoff	0	0
Kaliumpermanganat-Verbrauch . .	7,8	10,3
Gesamthärte (in deutschen Graden)	2,5	2,5
Bleioxyd	0	17,5

Die chemische Analyse läfst also erkennen, dafs das Wasser (II) der Zweigleitung stark bleihaltig ist und bestätigt so die ausgesprochene Vermutung der gemeinsamen Ursache der Vergiftungen.

Da leider nur zwei Liter des bleihaltigen Wassers zur Untersuchung eingesendet worden waren, konnte eine quantitative Bestimmung des Gehaltes an salpetriger Säure nicht mehr vorgenommen werden. Eine nach drei Wochen nachgesendete Probe aus der Bleirohrleitung, welche während dieser Zeit gesperrt war, ergab eine anscheinend gleich starke, qualitative Reaktion auf salpetrige Säure; die quantitative Bestimmung ergab einen Gehalt von nur 2,0 mg salpetriger Säure im Liter. Dagegen war der Bleigehalt von 17,5 mg auf 3,2 mg im Liter gesunken.

Dieses Sinken des Bleigehaltes legte die Vermutung nahe, dafs der Gehalt an salpetriger Säure, welchen man in Zusammenhang mit dem gelösten Blei brachte, äufseren Ursachen zuzuschreiben sein dürfte, wenngleich logischerweise in diesem Falle auch ein Ansteigen des Chlorgehaltes hätte erwartet werden sollen.

Auch der Gehalt an organischer Substanz bzw. der Verbrauch an Kaliumpermanganat in dem Wasser der Zweigleitung (II) zeigte eine kleine Erhöhung gegenüber jenem der Hauptleitung (I). In Berücksichtigung aller dieser Umstände und des vorliegenden Aktenmaterials wurde das Gutachten dahin abgegeben, dafs die bleilösende Wirkung des vorliegenden ziemlich weichen Wassers unterstützt worden sein dürfte 1. durch die ziemlich lange (680 m) Bleirohrleitung, 2. durch die Beschaffenheit des Wassers an sich, namentlich seine geringe Härte und 3. durch geringe Mengen von eindringenden, nitrithaltigen Fäkalwässern; die Möglichkeit des Eindringens der letzteren war an jener Stelle der Bleirohrleitung gegeben, wo dieselbe laut Protokoll in dem durch Fäkalwässer verseuchten Boden in der Nähe des die warmen Kondenswässer des Schachtes führenden Grabens gelegen war. Dort war jedenfalls leicht eine Verletzung bzw. Korrosion der Verbindungsstellen denkbar und infolgedessen ein Eindringen von Aufsenwasser. Bestärkt wurde man in dieser Ansicht durch den auffallend niederen Bleigehalt der der drei Wochen gesperrt gewesenen Leitung entnommenen Wasserprobe. Es ist leicht einzusehen, dafs ein beständiges Fliefsen des Wassers in den Röhren an undichten Stellen eine Saugwirkung äufsern und durch das Eindringen von Luft und Feuchtigkeit von aufsen die bleilösenden Eigenschaften des Wassers wesentlich erhöht werden konnten.

Stand dagegen das Wasser in der Leitung, so war ein Diffundieren von umgebender Feuchtigkeit durch den im Innern der Leitung herrschenden Druck erschwert bzw. unmöglich gemacht, daher der geringere Bleigehalt der Wasserprobe aus der 3 Wochen gesperrt gewesenen Leitung. Die im Protokoll erwähnten Druckschwankungen in der Leitung liefsen sich auch ziemlich ungezwungen mit Undichtigkeiten bzw. einer äufseren Verletzung oder Korrosion des Bleirohres in Einklang bringen, wiewohl sie ja auch anderen Ursachen hätten zugeschrieben werden können, und, nebenbei bemerkt, nach Wolffhügel[1]) bei dem Vorgange der Bleiaufnahme eine mehr untergeordnete Rolle spielen.

1) Arbeiten a. d. Kais. Ges.-Amte, II (1887), S. 509.

Auf jeden Fall wurde auf Entfernung der 680 m langen Bleirohrleitung gedrungen und dieselbe bei der Beschaffenheit des Wassers höchstens unter den üblichen Vorsichtsmafsregeln für die Hauseinleitung als zulässig erklärt.

Da den ausgesprochenen Vermutungen, namentlich was die Undichtigkeit der Leitung anbelangte, von der die Untersuchung leitenden Behörde nicht widersprochen wurde, mufste schliefslich angenommen werden, dafs dieselben den Tatsachen entsprechen, wiewohl alledem der sich in beiden Wasserproben gleichbleibende Chlorgehalt zu widersprechen schien.

Durch $1^1/_2$ Jahre später ausgeführte Versuche wurde unzweideutig festgestellt, dafs die Annahme der Undichtigkeit der Röhren, um die Anwesenheit der salpetrigen Säure zu erklären, gar nicht nötig war und sich die beobachteten Erscheinungen auch sonst ebensogut, wenn nicht besser anders erklären lassen. In einer von der grofsen Literatur, betreffend die Einwirkung von Wasser auf Bleiröhren, bisher völlig unberücksichtigt gebliebenen Abhandlung »Über Nitrifikation, III. Über die Umwandlung der alkalischen Nitrate in Nitrite« hat Schönbein[1]) schon im Jahre 1861 darauf hingewiesen, dafs Blei wässerige Lösungen von Alkalinitraten reduziert, indem Alkalinitrit gebildet wird und Blei in Lösung geht. Er hat diese Einwirkung auch bei anderen Metallen studiert und gefunden, dafs Cd, Zn, K und Na ebenso reduzierend wirken, Fe, Sn und Al dagegen nicht.

Ich habe zunächst diese Angaben hinsichtlich des Bleies nachgeprüft und kann sie bestätigen. Sodann erweiterte ich diese Nachprüfung hinsichtlich der für den Wasserleitungsbetrieb hauptsächlich in Betracht kommenden Metalle: Zink, Eisen, Kupfer, Zinn und der Legierung Messing, und kann für das Zink Schönbeins Beobachtung bestätigen, für Eisen dagegen nicht insoferne Eisen die anwesenden Nitrate auch, wenn auch in geringerem Grade reduziert als Zink. Kupfer, Zinn und Messing verhalten sich ganz indifferent. Die Versuchsanordnung war folgende: Zirka 20 cm lange, 0,8 cm dicke zylindrische Stäbe mit

1) Journ. f. prakt. Chemie, 84, 204.

blanker Oberfläche aus Zink, Eisen, Zinn, Kupfer und Messing wurden in 22 cm hohe mit eingeriebenen Glasstopfen verschliefsbare Glaszylinder gestellt, in welchen sich nitrathaltiges Quellwasser (ungefähr 20 mg Salpetersäure im Liter entsprechend) befand. Die Zylinder wurden unter Vermeidung von Luftblasen verschlossen und zwölf Stunden im Dunkeln stehen gelassen. Die Probe mit dem Zinkstabe war ganz milchig trübe, mit weifsem Bodensatz; das Filtrat liefs nach dem Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure und Zufügen von Jodzinkstärkekleister sofort durch Blaufärbung salpetrige Säure erkennen. Die Probe mit dem Eisenstab hatte reichlich Flocken von Eisenoxydhydrat abgeschieden; auch dieses Filtrat gab deutlich, wenngleich schwächer, die Reaktion auf salpetrige Säure. Die Zylinder mit den Kupfer-, Zinn- und Messingstäben enthielten ganz klare, farblose Lösungen, welche frei von salpetriger Säure waren.

Die von Schönbein zuerst ausgesprochene Einwirkung von Blei auf im Wasser gelöste Nitrate hat im vorliegenden Falle entschieden die gröfste Bedeutung und ein direkter Versuch gab nun Aufklärung über die Entstehung der salpetrigen Säure in dem Wasser der Bleirohrleitung.

Von dem Wasser der Hauptleitung war noch eine zwei Liter enthaltende, mit Pergament verbundene Flasche vorhanden. Es wurde zunächst die Bleifreiheit des Wassers konstatiert, sodann auf Salpetersäure und salpetrige Säure geprüft. Die Reaktion mit Diphenylamin-Schwefelsäure fiel auch diesmal, wie vor $1^1/_2$ Jahren schwach positiv aus; es konnte nur auf Spuren geschlossen werden, da die Reaktion äufserst langsam und nur ganz schwach eintrat. Salpetrige Säure war keine vorhanden, wie die Reaktion mit Jodzinkstärkekleister und verdünnter Schwefelsäure zeigte; selbst nach $1^1/_2$ stündigem Stehen trat keine Blaufärbung auf. Nun wurde in einen der oben erwähnten Glaszylinder ein ca. 10 cm langes, innen geschwefeltes Bleirohr[1]) von 0,5 cm Dicke und 1,3 cm lichter Weite gebracht, mit dem von salpetriger

1) Herrührend von der inkriminierten Leitung mit einem Gehalte von 99,92 % Blei.

Säure freien Wasser der Hauptleitung vollgefüllt und unter Vermeidung von Luftblasen verschlossen 24 Stunden an einen dunkeln Ort gestellt. Nach dieser Zeit war das Wasser im Zylinder von weifsen Flocken erfüllt, am Boden selbst befand sich ein weifser Niederschlag und im Wasser war Blei aufgelöst. Das durch Filtrieren von der Suspension getrennte, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuerte Wasser gab mit Jodzinkstärkekleister sofort deutlich und bald stärker werdend die für salpetrige Säure charakteristische Blaufärbung, so dafs durch diesen Versuch unzweideutig die Herkunft der salpetrigen Säure im Wasser der Zweigleitung erwiesen erscheint.

Natürlich interessierte unter diesen Umständen auch der Gehalt des Wassers der Hauptleitung an Salpetersäure, von welcher die Diphenylamin-Schwefelsäure-Reaktion nur Spuren angezeigt hatte. Die durchgeführte quantitative volumetrische Bestimmung ergab einen Gehalt von 9,1 mg im Liter. Wiewohl eine solche Menge nie einen Grund zur Beanstandung geboten hätte, läfst der Versuch doch erkennen, dafs die qualitative Salpetersäurreaktion mit Diphenylamin und konzentrierter Schwefelsäure unter Umständen zu Täuschungen über die Menge der wirklich vorhandenen Salpetersäure Anlafs geben kann; denn die Reaktion trat erst nach mehreren Minuten und dann nur kaum erkennbar ein, und als »Spur« ist eine scheinbar so geringe Menge wohl kaum zu bezeichnen. Die Reaktion auf salpetrige Säure hingegen war sehr intensiv, so dafs man anfänglich ihr Vorhandensein mit dem der Salpetersäure nicht in Zusammenhang brachte. Erst die quantitativen Bestimmungen führten auf diesen Gedanken. Der Versuch lehrt aber auch, wie geringe Mengen von Nitraten genügen, eine Bleilösung herbeizuführen, wobei im vorliegenden Falle die Länge der Bleirohrleitung allerdings als wesentlich unterstützendes Moment in Betracht zu ziehen ist. Ein wenn auch noch so geringer Nitratgehalt des Wassers dürfte daher jedenfalls bei Bleirohrleitungen als ganz besonders gefährlich anzusehen sein, ja sogar den Anlafs dazu bieten, bei einem solchen von Bleirohrleitungen überhaupt abzusehen. Auf die den Bleiangriff befördernde Fähigkeit der Nitrate hat auch neuer-

dings Ružička[1]) in seinen »Systematischen Untersuchungen über die Angreifbarkeit des Bleies durch das Wasser« mit Recht hingewiesen. Der vorliegende Fall bestätigt diese Tatsache ganz eklatant.[2])

Die im ersten Gutachten auffallenden Umstände fallen nunmehr ohne weiteres fort, weil sie sich mit den später festgestellten Tatsachen ganz gut in Einklang bringen lassen.

Es könnte aber jetzt, wo die Annahme einer Undichtigkeit in den Röhren überflüssig ist, auf den ersten Blick befremdend erscheinen, dafs, wie früher erwähnt, das Wasser, während es gesperrt in der Leitung gestanden, also seine Einwirkungsdauer auf die Bleiröhren eine gröfsere war, weniger Blei aufgelöst hatte als bei beständigem oder doch normalem Gebrauch. Eine Erklärung, welche die gröfste Wahrscheinlichkeit für sich hat, dürfte in der Überlegung gefunden werden, dafs die Einwirkungsdauer des Wassers nur scheinbar einen die Bleilösung begünstigenden Einflufs hat, der ja schon durch die vorhandene Nitratmenge begrenzt erscheint, in der Tat aber eigentlich einen hemmenden Einflufs zeigen mufs. Ružička[3]) stellt folgende Reihe von Salzen in bezug auf ihre Fähigkeit, den Bleiangriff zu beschränken, auf: Nitrat, Chlorid, Sulfat, Karbonat. Nitrate greifen am stärksten an, werden also zunächst mit dem Blei in Wechselwirkung treten, und es ist leicht denkbar, dafs bei geringen Mengen, wie sie z. B. hier vorliegen, die ganze verfügbare Menge in Reaktion tritt. Es wird dann bei beständig fliefsendem Wasser der hemmende Einflufs der Chloride, Sulfate und Karbonate gar nicht zur Geltung kommen, weil die Bildung der betreffenden Bleisalze, ihrer geringeren Löslichkeit entsprechend, in der kurzen Zeit nicht statthaben kann. Steht dagegen das Wasser in der Leitung, so kommt dieser hemmende

1) Archiv f. Hygiene, 41 (1902), S. 23.

2) Mit Ausnahme Kerstings (s. Wolffhügel, Arb. a. d. Kais. Ges.-Amte, II (1887), S. 507), der diese Tatsache in Abrede stellt, weisen alle Forscher, welche sich mit dem Studium der Einwirkung der im Wasser gelösten Nitrate auf Bleiröhren beschäftigt haben, auf die Fähigkeit derselben hin, die lösende Wirkung des Wassers zu erhöhen.

3) Archiv f. Hygiene, 41, S. 31.

Einflufs sehr wohl zur Geltung, indem jetzt die Umsetzung mit den Chloriden, Sulfaten und Karbonaten allmählich vor sich gehen kann und so ein Teil des ursprünglich gebildeten löslichen Bleisalz in unlösliches übergeht, also der Lösung entzogen wird und durch Bildung einer Schichte an den Rohrwandungen einen weiteren Bleiangriff wesentlich erschweren wird. Es kommt also beim Stehen des Wassers in der Leitung namentlich der Überschufs der Chloride, Sulfate und Karbonate gegenüber den Nitraten in Betracht, und hiermit scheint die auf den ersten Blick auffallende Erscheinung, dafs das stehende Wasser weniger Blei aufgelöst hatte als das fliefsende, ziemlich ungezwungen erklärt. Es soll diese Erklärung nicht als die einzig mögliche hingestellt und der Einflufs des Luftsauerstoffs, der ja immerhin im fliefsenden Wasser mehr zur Geltung kommen könnte als im stehenden, dadurch in Abrede gestellt werden.

Was die Erklärung des Bleiangriffs überhaupt anbelangt, kann man der Anschauung, welche sich Ružička[1]) hierüber bildet, vollkommen beipflichten; nur hat man, wie ich glaube, nicht notwendig, bei der Einwirkung des blofsen destillierten Wassers auf Blei die Anwesenheit von gelöster Luft bzw. Sauerstoff anzunehmen[2]), da ja das destillierte Wasser selbst zu einem (wenn auch geringen) Teile jonisiert ist und die Anwesenheit von geringen Mengen von freien H- und OH-Jonen die Bildung des Bleioxydhydrates auch im destillierten Wasser hinreichend erklärt. Aus den Tabellen, welche Ružička bei seinen Experimenten über den Einflufs der verschiedenen Salze auf die Löslichkeit des Bleies in Wasser aufgestellt hat, geht ferner hervor, dafs dieser Einflufs durchwegs und zwar bei verhältnismäfsig kleiner Konzentration der Lösungen ein Maximum erreicht, welches sehr wahrscheinlich das Maximum der Jonisation des betreffenden Salzes anzeigt, bei welchem der stärkste Bleiangriff erfolgt. Bei zunehmender Konzentration erfolgt dann wieder eine Abnahme der Bleilöslichkeit. Es scheint nicht unwichtig,

1) Archiv f. Hygiene, 41, S. 42.

2) R. sagt »destilliertes Wasser, welches angeblich Luft resp. Sauerstoff enthalten mufs«.

auf diese Tatsache hinzuweisen, wiewohl der obgenannte Autor selbst es unterlassen hat, weil sie vollkommen in Einklang mit den Jonisationsvorgängen steht.

Auch die Bildung der salpetrigen Säure ist auf diese Vorgänge zurückzuführen. Denn die im Wasser vorhandenen H-Jonen (von der Jonisation des Wassers herstammend) und die aus den Nitraten stammenden NO_3-Jonen wirken bleilösend; der hierdurch disponibel werdende Wasserstoff hat nun Gelegenheit, auf einen Teil der vorhandenen Nitrate reduzierend zu wirken und dadurch die Bildung von salpetriger Säure bzw. Nitriten zu veranlassen.

Bei allen diesen Lösungsvorgängen hat sich auch im vorliegenden Fall die Schwefelung der Bleirohre, welche auch in Österreich durch einen Ministerial-Erlafs vom 27. November 1884 gefordert wird, ziemlich illusorisch erwiesen. Darauf haben früher schon Bělohoubek, Hammon und Reichardt hingewiesen. Die leichte und stets ungleich dichte oberflächliche Schichte von Schwefelblei, welche sich bei der üblichen Schwefelung bilden kann, bietet sicher den Angriffen der einzig und allein bei einer Bleilösung in Betracht kommenden Säuren der betreffenden Salze kein genügendes Hindernis. Im vorliegenden Falle ist das zum mindesten als erwiesen zu betrachten, da der Bleiangriff erfolgte, trotzdem die Rohre geschwefelt waren. Geschwefelte dürften daher ungeschwefelten Rohren ziemlich gleichzuhalten sein und zur Beurteilung, ob in einem konkreten Falle Bleiröhren überhaupt zuzulassen sind, lediglich das betreffende Wasser nach eingehenden Versuchen bezüglich seiner Fähigkeit, Blei anzugreifen, zu gelten haben.

Die Bakteriendurchlässigkeit der normalen Magendarmschleimhaut im Säuglingsalter.

Von

Dr. med. **R. Hilgermann.**

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin. Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. M. Rubner.)

(Mit Tafel II.)

In der kürzlich erschienenen Arbeit[1]) Fickers, in welcher letzterer die Durchtrittsmöglichkeit von Bakterien durch die normale Schleimhaut des Intestinaltraktus säugender Tiere kulturell erwiesen hatte, deutete er bereits auf den Wert des Studiums von Schnittpräparaten hin, um oben erwähnte Übertrittsverhältnisse und das Verhalten des Schleimhautepithels noch genauer prüfen und präzisieren zu können.

Auf Anregung von Herrn Geheimrat Rubner habe ich in Gemeinschaft mit Herrn Professor Dr. Ficker, dem ich an dieser Stelle für seine Unterstützung und Anleitung bei Abfassung der Arbeit meinen herzlichsten Dank ausspreche, einige weitere Fütterungsversuche an neugeborenen Tieren gemacht und deren Ergebnisse vom pathologisch-anatomischen Gesichtspunkt aus festzustellen versucht. Gemäfs der Versuchsanordnung Fickers in seiner Arbeit wurde wiederum ein Bazillus aus der Gruppe der säurefesten und zwar der unbewegliche Blindschleichentuberkelbazillus gewählt, dessen Nachweis in der Darmwand oder

1) M. Ficker, Über die Keimdichte der normalen Schleimhaut des Intestinaltraktus. Archiv f. Hygiene, Bd. 52.

den Organen unschwer ist. Um aber den etwaigen Einwurf zu entkräften, dafs es sich hierbei doch immerhin um einen infektiösen Keim handle, kam aufserdem ein nicht infektiöser Bazillus aus der Gruppe der säurefesten, der »Petribazillus«, noch zur Verwendung.

Versuch I.

Einem 1 Tag alten Kaninchen wird aus der Pipette ca. 1 ccm einer Aufschwemmung von 2 Blindschleichentuberkulose-Agarkulturen in ca. 50 ccm Milch auf die Zunge geträufelt. Das Tier macht deutliche Schluck- und Saugbewegungen. Nach $1^1/_2$ Stunden Tötung durch Strangulation und sofortige Sektion. Magen, Milz, Leber und Nieren werden in toto in 6 proz. Formaldehydlösung gelegt, der Darm in kleinste, ca. $^1/_4$—$^1/_2$ cm lange Stückchen zerschnitten und ebenfalls in Formalin gebracht. Darauffolgende Paraffineinbettung teils nach dem Verfahren von Lubarsch, teils gemäfs dem von Henke[1]) angegebenen Azeton-Paraffinverfahren.

Von dem Magen- und Darmtraktus wurde sodann in verschiedenen Höhen mit Berücksichtigung der einzelnen Übergänge Serien in der Schnittdicke von 5—10 μ gefertigt. Färbung mit Hämatoxylin-Karbolfuchsin nach der Ziehl-Nielsenschen Methode oder mit Karbolfuxin-Methylenblau.

Versuch II.

Meerschweinchen, 1 Tag alt, wird mit der gleichen Suspension gefüttert. Weitere Versuchsanordnung wie bei Versuch I.

Versuch III.

Kaninchen, 1 Tag alt, erhält eine Aufschwemmung von 5 Ösen einer 48 Stunden alten Petribazillenaufschwemmung in 2 ccm sterilem Wasser auf die Zunge geträufelt. Tötung nach $1^1/_2$ Stunden durch Strangulation und sofortige Sektion.

Die Organe werden teils in 6 proz. Formaldehydlösung, teils in Zenkersche Lösung gelegt.

Paraffinbettung und Färbung wie bei Versuch I.

Parallel mit diesen Verfütterungsversuchen wurden Kontrollprüfungsversuche angelegt behufs Feststellung der Fixationsfähigkeit der zur Anwendung gelangenden Lösungen. Es wurden 3 Ösen der verwandten Kulturen sowohl in Formalin als in Zenkerscher Lösung aufgeschwemmt und von dieser Aufschwemmung je 5 Ösen nach 5, 10, 15 und 20 Minuten in Bouillon übertragen. Gleichzeitige Anlegung von Kontrollröhrchen,

1) Henke-Zeller, Azeton-Paraffin-Schnelleinbettung. Zentralbl. f. allgem. Pathologie u. patholog. Anatomie, Bd. XVI, Nr. 1.

d. h. es wurden Bouillonröhrchen mit 1 Nadelspitze Kultur und 5 Ösen der verwandten Fixationsflüssigkeiten beschickt. Sämtliche Röhrchen wurden durch ca. 8 Tage beobachtet. Die Röhrchen der Serie I blieben steril, die Kontrollröhrchen dagegen waren stets positiv. Aufserdem wurden noch späterhin von sämtlichen Röhrchen Agarplatten angelegt, die dasselbe Resultat wie oben ergaben.

Postmortale Wachstumsvorgänge, bedingt durch ungenügendes Abtöten der Kulturen innerhalb der verwendeten Fixationsflüssigkeiten, sind also auszuschliefsen.

Die durch die Versuche I und III, also beim Kaninchen gewonnenen Serienschnitte ergaben zunächst, dafs die verfütterten Bakterien im Magen einer Auflösung nicht anheimgefallen, sondern dafs sie in den Darmkanal selbst gelangt waren.

In den oberen Partien des Dünndarmes liefsen sie sich am reichlichsten nachweisen, um sodann gegen das Gebiet des Dickdarmes hin und in diesem selbst allmählich an Intensität abzunehmen. In der Lagerung der Bakterien innerhalb des Lumens war eine gewisse Gruppierung insofern zu erkennen, als sie sich im Magen und Dünndarm teils im freien Lumen selbst befanden, teils in kleineren Häufchen der Höhe der Zotten angelagert waren. Im Dickdarm hingegen fanden sich wohl im Anfangsgebiet spärliche Häufchen, weiterhin aber nur einzelne, versprengte Keime.

Aufser dieser Passage der Bakterien in den Darmtraktus konnte ferner sowohl im Magen, als auch im Verlaufe des ganzen Darmkanals ein Durchtritt in die Schleimhaut selbst konstatiert werden. Abgesehen von einzelnen, ohne besonderes Bindeglied übergetretenen Bazillen, möchte ich gemäfs der Übereinstimmung der verschiedenen Bilder eine Art etappenförmige Lagerung der Bakterien in der Schleimhaut annehmen.

Betrachten wir uns im mikroskopischen Bilde die Magenschleimhaut, so sehen wir zunächst, wie bereits oben angegeben, Bakterien der Höhe der Zotten angelagert. Diese Anlagerung einzelner Bakterien, vielleicht von dem übrigen, unge-

hindert passierenden Hauptteil passiv abgesondert, vielleicht auch durch aktive Kräfte zur Resorption herangezogen, dürfte die erste Stufe und gewissermaſsen den Stützpunkt für den Eintritt bilden. Läſst sich doch gerade an dieser Stelle das typisch-stufenförmige Vordringen der Bakterien studieren. Schon an diesen Bakterienhäufchen selbst kann man eine losere und eine engere Anlagerung an die Zotte erkennen. Etwas abgelöst von dem eigentlichen Häufchen sieht man, wie ein vorgeschobener Bazillus sich auf das innigste dem achsialsten Teil der Zelle anlagert, fast als ob sein Durchgang in die Schleimhaut unmittelbar bevorstände. In einem zweiten Stadium ist ein anderer bereits im Zustande des Übertritts zu erkennen, wie er gerade durch die Schleimhautgrenze hindurchschlüpft. Besonders gut läſst sich dieser Eintritt in die Schleimhaut studieren, wenn der Bazillus noch halb im freien Lumen, halb in der Zellpartie gelagert anzutreffen ist. In den verschiedensten Richtungen vollzieht sich der Übergang, bald sind die Bazillen direkt senkrecht, bald schräg, bald horizontal gelagert. Immer aber handelt es sich, um diesen Punkt noch einmal hervorzuheben, um vereinzelte Bakterien, die in der Zahl ihres Übertritts in keinem Verhältnis zu der des Lumeninhaltes stehen. Als Folge auf diesen im Durchtritt begriffenen Bazillus kann man sodann einen anderen, d. h. den nächst vorhergegangenen wohl, bereits völlig durchgetreten sehen. Seinen Abschluſs findet also dieser Übertritt mit der Lagerung des Bazillus in der Zelle selbst. In der Zelle ist die Lagerung eine stets völlig gleichartige: in der Mitte des Protoplasmas zwischen Kern und Grenze der Zelle (Fig. I).

Gemäſs den Diſseschen[1]) Untersuchungen über die unvollkommene Schleimbildung in jugendlichen Zellen wird diese Lagerung mitten im Protoplasma verständlich. Geschlüpft durch die Lücken des natürlichen Schutzwalles des vorerst noch aus einzelnen zusammenhangslosen Kugeln bestehenden Schleimüberzuges, muſs der Bazillus, tritt er in die Zelle ein, an dieser Stelle des Protoplasmas zu liegen kommen. Eine Kombination von

1) Diſse, Untersuchungen über die Durchgängigkeit der jugendlichen Magendarmwand für Tuberkelbazillen. Berliner klin. Wochenschr., 1903, S. 4.

Schleim- und Bazillenfärbung, die wohl am ehesten in diese Verhältnisse Klarheit bringen könnte, ist mir nicht gelungen.

Handelt es sich nun wirklich bei diesen Bildern um eine Aufnahme seitens der Schleimhaut, nicht um ein Kunstprodukt beim Einbetten oder Schneiden, so mufs man die Bakterien auch weiterhin verfolgen können. Ist ja doch eine Verschleppung der Bakterien, sind sie einmal in die Zelle gelangt, auf dem Wege der Blut- oder Lymphbahn, leicht erklärbar. In der Tat folgte auf die Lagerung in der Zelle — wie die mikroskopischen Bilder zeigten — der Durchtritt in das Zottenlumen und schliefslich in die inneren Organe, vor allem in die Milz. Letzteres habe ich vorweggenommen, da ja diese Ergebnisse für den Magen wie den Darm gleichbedeutend sind.

Was den Darm anbetrifft, so wurde sowohl der Dünndarm, als der Dickdarm, besonders auch der proc. vermif. untersucht. Hier zeigte sich ein wesentlicher Unterschied in der Anzahl der durchgetretenen Keime im Verhältnis von Dünn- und Dickdarm. Während im Dünndarm, zumal im oberen Drittel, ein reichlicher Übertritt erfolgt war, nahm derselbe im Dickdarm bedeutend an Stärke ab. Nur noch vereinzelte Bakterien wurden innerhalb der Schleimhaut gefunden. Zieht man aber in Betracht, was ich oben bereits über die geringe Anzahl der Bakterien im Lumen des Dickdarmes sagte, so wird diese anscheinend verminderte Schleimhautdurchgängigkeit verständlich. Ist doch sicherlich von der jedesmaligen Menge der Bakterien im Lumen die Durchtrittsmöglichkeit durch die Schleimhaut abhängig.

Im allgemeinen boten die mikroskopischen Bilder des Darmes Übereinstimmung mit denen des Magens, indem auch sie einen allmählichen Übertritt der verfütterten Bakterien zeigten. Erst wiederum die Anlagerung der Bakterien auf der Höhe der Zelle, dann der Durchtritt und schliefslich ihre Lagerung im Protoplasma (Fig. II).

Im proc. vermif. waren die Übertrittsverhältnisse denen im Dünndarm gleich zu achten, eine stärkere Beteiligung also direkt nicht vorhanden. Bedenkt man aber, dafs die Knickung des proc. vermif. eigentlich an und für sich eine Passage für

durchgehende Fremdkörper einschränken müfste, so kann man in Erwägung der gleichen Übertrittsverhältnisse wie im Dünndarm immerhin von einer stärkeren Beteiligung sprechen. Da ferner der proc. vermif, gerade zu Entzündungen und Läsionen geneigt ist, so ist er vielleicht doch als Prädilektionsstelle für einen Übertritt von Bakterien in Betracht zu ziehen.

Die in Vorstehendem angegebenen Resultate beziehen sich auf die Versuche I und III, also beim Kaninchen. Bei dem Versuch II, bei dem das Meerschweinchen als Versuchstier benutzt wurde, zeigten die Untersuchungsergebnisse, obwohl der Versuch in derselben Weise wie beim Kaninchen ausgeführt worden war, das Tier also die ungefähr gleiche Bakterienmenge erhalten haben mufste, wesentliche Unterschiede gegenüber Versuch I und III. Fanden sich beim Kaninchen die verfütterten Bakterien in reichlicher Menge im Lumen des Magen- und Darmkanals wieder, so war beim Meerschweinchen ein bedeutend geringeres Vorhandensein derselben zu konstatieren, insonderheit zeigte das Lumen des Magens dieselben nur in spärlichen Resten. Was die Eintrittsverhältnisse in die Schleimhaut selbst anbetrifft, so habe ich im Magen einen Übertritt nicht finden können. Im Darm war ein Eintritt in die Schleimhaut wohl erfolgt, doch waren nur ganz vereinzelte Bakterien übergetreten, auch diese meist noch im Anfangsstadium des Übertritts. Der Schleimhautoberfläche eng angelagert, sah man öfters vereinzelte Bakterien, ohne aber gleichzeitig einen Eintritt finden zu können, fast gewann man hierbei den Eindruck, als ob die Bakterien durch einen natürlichen Wall, den die Schleimhautoberfläche zu bilden schien, nicht hindurchdringen könnten. Sicherlich waren die Durchtritts- und Eingangsverhältnisse in die Schleimhaut nicht mit denen beim Kaninchen zu vergleichen. Während hier ein deutlich stufenförmiges Eintreten beobachtet werden konnte, das unbehindert vor sich zu gehen schien, konnte beim Meerschweinchen nur von einem vereinzelten und mühsamen Eindringen die Rede sein. Ob hierbei Rassenunterschiede, bzw. besondere Schutzvorrichtungen der Schleimhaut mitsprachen, kann zurzeit nicht entschieden werden.

Mit dem Beweis des Eintritts der Bakterien in die Schleimhaut ergab sich die weitere Frage, welche Faktoren diesen Durchtritt ermöglicht haben konnten, und auf welchem Wege derselbe erfolgt sein mochte. Zunächst lag gewifs der Gedanke nahe, an einzelne, zufällig vorhandene Läsionsstellen zu denken. Diese Annahme war aber auszuschliefsen, da sich zeigte, dafs der Übertritt nicht an einzelnen Punkten, sondern im Verlaufe der ganzen Länge des Magen-Darmkanals erfolgt war. Ebensowenig konnte bei der immerhin grofsen Anzahl verfütterter Keime von einem natürlichen Überfluten, von einer durch Reizwirkung hervorgebrachten direkten Eintrittsmöglichkeit die Rede sein. Wäre dies wirklich der Fall gewesen, dann hätten viel zahlreicher und nicht in so typisch-vereinzelter Anordnung innerhalb der Zellen und Zotten die Bakterien durchtreten müssen. Besteht ferner ein Unterschied zwischen Meerschweinchen und Kaninchen in ihrer Aufnahmefähigkeit für Bakterien wirklich zu recht, so würden gerade die beim Meerschweinchen gefundenen Verhältnisse letztere Behauptung bestätigen, indem hier trotz einer geringen Menge von Bakterien innerhalb des Darmlumens doch Bakterien übergetreten waren. Auch wäre vom technischen Standpunkt aus ein Durchtrittsnachweis einzelner verfütterter Keime bei der grofsen Länge des Magen-Darmkanals unmöglich gewesen.

Viel näher liegt wohl der Gedanke, zu glauben, dafs gemäfs der Behauptung v. Behrings die Schleimhaut im jugendlichen Alter der natürlichen Schutzstoffe entbehre, um einen Übertritt durchwandernder Bakterien verhindern zu können.

Der Nachweis der verfütterten Keime in inneren Organen dürfte ferner den Einwurf entkräften, dafs es sich bei diesen Lagerungsverhältnissen innerhalb der Schleimhäute vielleicht um eine mechanische Einwirkung beim Einbetten oder beim Schneiden handeln könnte. Gegen diese Annahme spricht auch der Umstand, dafs ich sowohl beim Magen wie beim Darmtraktus die Bakterien innerhalb der Zotten auch an Stellen gefunden habe, wo weder auf der Zottenhöhe noch in der sichtbaren Peripherie des Lumens Bakterienhaufen vorhanden waren.

Es bleibt noch die Frage offen, an welcher Stelle eigentlich der Durchtritt erfolgt sei. Ob nun, wie Difse nachgewiesen, die mangelhafte Schleimbildung im jugendlichen Alter wenigstens für den Magen, oder ob die Interzellularräume- und Brücken einen Durchtritt begünstigen, oder ob die Zelle selbst aktive Funktionen übernimmt, entzieht sich der Beobachtung. Gemäfs dem oben beschriebenen stufenweisen Eintreten möchte ich aber glauben, dafs es sich um eine aktive Tätigkeit seitens der Schleimhaut handele. Bei dieser gewissermafsen sich aneinander reihenden Lagerung der Bakterien ist wohl eine Tätigkeit der Zelle selbst, event. ein Weiterschleppen durch dazu befähigte Zellen, anzunehmen.

Mit dem Nachweis, dafs Bakterien durch die noch ungeschützte Magendarmwand aufgenommen werden können, darf auch mit einer Infektionsmöglichkeit im jugendlichen Alter gerechnet werden. Denn ähnlich wie bei den Fütterungsversuchen, bei denen eine gröfsere Menge Bakterien den Magen-Darmtraktus überschwemmt, liegen schliefslich auch die Verhältnisse bei einer bakterienhaltigen Ernährung, bei der die stete Summation dem augenblicklichen Reichtum an Bakterien der Fütterungsversuche ziemlich gleichzusetzen ist.

Erklärung der Abbildungen.

Figur I. Leitz: Okul. I. Obj. $^1/_{12}$ Öl-Immersion. Tubuslänge 170 mm. Technik: Paraffineinbettung, Hämatoxylin-Karbolfuchsin. Das Bild zeigt einen Durchschnitt durch die Schleimhautoberfläche des Kaninchenmagens. Die Tuberkelbazillen sind teils im freien Lumen, teils bereits in den Epithelzellen selbst gelagert.

Figur II. Leitz: Okul. I. Obj. $^1/_{12}$ Öl-Immersion. Tubuslänge 170 mm. Technik: Paraffineinbettung, Karbolfuchsin-Methylenblau. Figur II gibt einen Querschnitt und einen Längsschnitt einer Dünndarmzotte vom Kaninchen wieder. Die Tuberkelbazillen sind sowohl im Begriffe des Durchgangs durch die Schleimhautoberfläche als auch innerhalb der Zellen.

Blutparasiten und Erythrocytolyse.

Von

Dr. A. Nifsle.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin. Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. M. Rubner.)

Am Schlusse eines kürzlich in diesem Archiv erschienenen Aufsatzes habe ich auf die engen Beziehungen hingewiesen, die zwischen dem Verschwinden von Trypanosomen aus der Blutbahn eines infizierten Tieres und dem gleichzeitigen Auftreten einer bisweilen erheblichen Anämie bestehen, mochte die Heilung oder Remission eine spontane oder eine durch künstliche Mittel herbeigeführte sein. Hierin zeigten auch alle drei mir zu Gebote stehenden Trypanosomenarten, Tr. Brucei, Tr. equinum und Tr. Lewisii keine prinzipiellen Unterschiede.

Diese Erscheinung tritt naturgemäfs um so deutlicher hervor, je reichlicher Trypanosomen im Blut vorhanden sind und je akuter sie daraus verschwinden; denn so wird es dem Blutregenerationsapparat unmöglich, für die gleichzeitig erfolgte Zerstörung von roten Blutkörperchen auch nur mit minderwertigem Material in der nächsten Zeit einen irgendwie erheblichen Ersatz zu schaffen. Dementsprechend liegen die Resultate der Blutkörperchenzählung in diesen Fällen weit aufserhalb der Fehlergrenzen; bei meinen Versuchen an kleinen Tieren betrugen die Differenzen stets Millionen pro Kubikmillimeter.

Von dem zeitlichen Zusammenfall der beiden Erscheinungen kann man sich am besten in der Weise überzeugen, dafs man Mäuse, die schon einigermafsen reichlich Cadérastrypanosomen oder die von Martini aus einem Togohengst gewonnene Naganaparasiten aufweisen, mit schwachen Trypanrotdosen, etwa 0,2—0,3 der 1proz. Lösung pro 15 g Maus, behandelt. Unter diesen Bedingungen tritt häufig in 24 Stunden noch keine Heilwirkung ein, im Gegenteil haben sich die Trypanosomen in dieser Zeit manchmal noch vermehrt und ebenso findet man die Zahl der roten Blutkörperchen kaum oder doch nur wenig vermindert, und erst am Tage darauf läfst sich das Verschwinden der Trypanosomen und das gleichzeitige Einsetzen der oft recht erheblichen Anämie mit Sicherheit konstatieren. Dieser Synchronismus tritt aber auch bei den spontanen Remissionen, wie sie im Verlauf einer Cadéras- oder Naganainfektion bei Meerschweinchen häufig zn beobachten sind, sowie bei Ratten unmittelbar nach der spontanen Heilung von einer Infektion mit Tr. Lewisii deutlich hervor, vorausgesetzt, dafs Remission bzw. Heilung einigermafsen akut verlaufen.

Es lag daher nahe, zu prüfen, ob Stoffe, die anerkanntermafsen Hämolyse hervorbringen, auch imstande sind, die Parasiten zu beeinflussen. In der Tat ist es mit derartigen Substanzen — nach den bisherigen Versuchen besonders mittels Toluylendiamin — gelungen, Trypanosomen selbst bei ziemlich weit vorgeschrittenen Erkrankungen teils bis auf vereinzelte Exemplare, teils vollständig, wenn auch nur zeitweise, zum Verschwinden zu bringen. Von den Resultaten dieser Versuche mag in diesem Aufsatz nur erwähnt werden, dafs auch hier manchmal erst am zweiten Tage die Wirkung sich zeigte, und dafs in solchen Fällen die Blutkörperchenzählung die gleichen Veränderungen ergab, wie sie eben bei der Anwendung von Trypanrot geschildert wurden. Reichte die Dosis nicht hin, eine deutliche Hämolyse zu erzeugen, so war auch eine Verminderung der Flagellaten nicht zu konstatieren.

All diese Beobachtungen waren geeignet, in mir immer mehr die Überzeugung zu befestigen, dafs Vernichtung der Trypa-

nosomen und Hämolyse die eng miteinander verbundenen Funktionen einer Substanz darstellen. Da die Anhäufung dieser Substanz bei Infektionen von Ratten mit Tr. Lewisii zu lang dauernder Immunität führt, so halte ich auch in allen Fällen, wo es zu einer spontanen Verminderung von Trypanosomen unter gleichzeitiger Blutkörperchenzerstörung kommt, die Annahme für berechtigt, dafs das wirksame Prinzip von Körperzellen erzeugt wird, die in dieser Weise auf die Schädigung reagieren, welche durch Einwirkung der im Blut enthaltenen Parasiten entsteht.

Wenn nun auch die Schädigung, auf die eine chemische Reaktion erfolgt, in letzter Linie selbst chemischer Natur sein mufs, so dürfen doch wohl mechanische Momente, wie das Eindringen von Trypanosomen in Erythrozyten und ihr Durchschlüpfen durch dieselben, auf die ich in meiner vorigen Arbeit aufmerksam machte, als Vorbedingungen in Betracht gezogen werden. Dafür spräche die Tatsache, dafs das Durchschlüpfen durch die Blutkörperchen besonders häufig bei längerem Vorhandensein zahlreicher Flagellaten im Blut, also auch kurz vor den Remissionen beobachtet werden kann. Anderseits mag auch allein schon eine Erklärung in dem Sinne ausreichend erscheinen, dafs die Trypanosomen als tierische Zellen in ihrer chemischen Zusammensetzung eine relative Ähnlichkeit mit den Erythrozyten besitzen und durch ihre Anhäufung deshalb auch eine gegen diese gerichtete Reaktion auslösen; denn vorläufig liegt für mich kein Grund vor, die Blutkörperchenauflösung nur als eine Nebenwirkung eines Zellimmunkörpers aufzufassen, wie sie v. Dungern als solche bei seinen Versuchen über Epithelimmunserum festgestellt hat, da doch sonst eine bisher wenigstens als rein hämolytisch bekannte Substanz, wie das Toluylendiamin, nicht gleichzeitig in solchem Mafse die Trypanosomen zerstören könnte.

Auf die Tatsache, dafs die Beziehungen zwischen Trypanosomen und roten Blutkörperchen enger sind als zuerst scheinen mag, deuten aufser den in meinem letzten Aufsatz angeführten Beobachtungen eine Anzahl wesentlicher Übereinstimmungen mit

dem Verlauf einer Blutkrankheit, bei der die endoglobuläre Lage des Erregers von vornherein auf nähere Beziehungen zwischen ihm und dem Erythrozyten schliefsen läfst, nämlich der menschlichen Malaria und besonders des auf dieser Basis entstandenen Schwarzwasserfiebers.

Ehe ich auf eine Untersuchung derselben eingehe, möchte ich noch auf eine Erfahrung hinweisen, die ich an der Wirkungsweise von verschieden grofsen Dosen solcher Stoffe machen konnte, welche Trypanosomeninfektionen günstig beeinflussen. Der sichtbare Effekt steigt nämlich nicht gleichmäfsig proportional der angewandten Menge des Mittels, sondern mehr sprungweise, so dafs er graphisch als eine terrassenförmig ansteigende Linie, deren erster Abschnitt in der Abszisse selbst verläuft, dargestellt werden müfste. Bei manchen Stoffen mufs man sogar weit über 50% derjenigen Menge hinausgehen, die gerade zur vollkommenen Beseitigung der Trypanosomen erforderlich ist, um überhaupt einen, wenn auch meist gleich reichlichen Erfolg zu erzielen; und das ist ja auch natürlich, da man doch wohl annehmen mufs, dafs die Widerstandsfähigkeit eines grofsen Teils der Parasiten ungefähr die gleiche ist. Deshalb ist es auch kaum zu verwundern, wenn auch die spontanen Verringerungen der Parasitenanzahl, mag es sich um Remission oder Heilung handeln, sehr häufig ebenfalls deutlich sprungweise erfolgen; besonders tritt dies bei der Infektion von Ratten mit Tr. Lewisii hervor. Die Anhäufung von Antikörpern mufs eben erst einen gewissen Grad erreicht haben, ehe ihre Wiikung manifest werden kann.

Wenn ich nun dazu übergehe, die menschliche Malaria zum Vergleich mit den bei Trypanosomiasis gewonnenen Resultaten heranzuziehen, so ist für die Auswahl dieser Bluterkrankung aufser der endoglobulären Lage der Parasiten das Vorhandensein der grofsen Menge von Literatur mafsgebend gewesen, die den Mangel entsprechender, eigener Versuche bis zu einem gewissen Grade zu ersetzen vermag.

Ich beginne mit dem Schwarzwasserfieber, da hier die Hämolyse in den Vordergrund der Erscheinungen tritt und deshalb am genauesten studiert worden ist.

In der Mehrzahl der Fälle sind es zwei Momente, die bei dieser Erkrankung konstatiert werden können, das Vorhandensein von Malaria und eine dem Anfall kurz voraufgegangene Chiningabe. Dazu ist zu bemerken, dafs für das Chinin auch manche anderen Medikamente eintreten können wie Phenacetin, Salipyrin, Methylenblau (F. Plehn, A. Plehn, Kleine, Panse), ferner Erkältungen, Überanstrengungen, Verletzungen (A. Plehn), dafs aber auch sichere Fälle beobachtet worden sind, wo aufser der Malaria keine weiteren Anhaltspunkte gefunden werden konnten (A. Plehn, Daniels, Moffat); ».... und selbst ohne nachweisbare besondere Veranlassung tritt der Blutzerfall zuweilen im Verlauf eines Malariafiebers ein« (A. Plehn).

Dagegen dürfte heutzutage die auf vielen Erfahrungen beruhende Ansicht kaum mehr ernstlichen Zweifeln begegnen, dafs Schwarzwasserfieber nur bei Malariakranken vorkommt; daran kann auch der ganz vereinzelt dastehende, von Krönig veröffentlichte Fall einer Sepsis nichts ändern, bei dem auf 1 g Phenacetin Ikterus, Hämoglobinurie und Temperatursteigerung eingetreten war. Anderseits verursacht Chinin allein auch in hohen Dosen niemals Hämoglobinurie.

R. Koch hat zuerst festgestellt, dafs Schwarzwasser nicht nur bei Tropica, sondern auch bei Tertiana beobachtet werden kann; Otto führt aufserdem einen Fall an, bei dem Quartanaparasiten als Malariaerreger diagnostiziert worden waren.

Da das Schwarzwasser nur in bestimmten Bezirken heimisch ist, so hat Koch ferner das Klima als disponierendes Moment beschuldigt, doch kann auch diese Theorie keine absolute allgemeine Gültigkeit beanspruchen, da, wie der Ottosche Fall beweist, die Disposition bisweilen auch in unsern Breiten erworben wird.

Die Beschränkung des Schwarzwasserfiebers auf bestimmte Bezirke, die allerdings in Afrika nach F. Plehns Angaben deutlich an Umfang gewinnen, sucht dieser Autor mit der eventuellen Verbreitung bestimmter Arten der Malariamücken zu erklären. Stephens nimmt eine höhere Virulenz der Parasiten und eine Änderung der Konstitution der in Schwarzwassergegenden

lebenden Europäer an. A. Plehn glaubt, »dafs die Schwarzwasserdisposition auf einer zeitweisen funktionellen Erschöpfung der blutbereitenden Organe beruht, und dafs diese Erschöpfung infolge der übermäfsig gesteigerten Regenerationstätigkeit eintritt, welche notwendig wird, um die durch latente und manifeste Malaria fortgesetzt geschaffenen Verluste zu decken.« F. Plehn führt die Disposition auf die gelegentliche Bildung eines Blutgiftes durch die Malariaparasiten zurück, welches die Blutkörperchen aufserordentlich geneigt zum Zerfall mache.

Dafür, dafs die Menge der Parasiten nicht in Betracht kommt, sind besonders zwei von Koch beobachtete Fälle beweisend, die tödlich verliefen, aber, obgleich in dem einen 30, in dem andern gar 80% der Erythrozyten infiziert waren, keine Spur von Hämoglobinurie zeigten; im Gegensatz dazu berichtet Koch über Schwarzwasserfälle, die vor Beginn der Hämoglobinurie nur ganz spärliche Parasiten aufwiesen.

Nun ist bisher allen, die Schwarzwasserkranke zu beobachten Gelegenheit hatten, aufgefallen, dafs bei der grofsen Mehrzahl der Patienten mit dem Anfall die Parasiten verschwinden. Der Zeitpunkt des Verschwindens hängt von der Schnelligkeit und Ausdehnung des Blutzerfalles ab (A. Plehn); dieses selbst erfolgt zweifellos rascher als bei einer unter Chininbehandlung normal verlaufenden Malaria (Panse). Aufserdem deutet das relativ häufigere und längere Ausbleiben von Rezidiven, auch wenn kein Chinin weiter gegeben wurde, darauf hin, dafs die Chininwirkung nicht unmittelbar mit dem Verschwinden der Parasiten in Zusammenhang stehen kann.

Wollte man nun annehmen, dafs die mit Parasiten besetzten Erythrozyten zuerst und mit diesen die Parasiten bei der Hämolyse zerstört werden, so müfsten nach dem Anfall die Parasiten jedesmal vermifst werden.

Eine verhältnismäfsig einfache Erklärung findet diese Erscheinung erst, wenn man die Resultate, welche die Beobachtungen am trypanosomenkranken Tieren ergeben haben, heranzieht und auch hier annimmt, dafs während jeden Malariaanfalls mikrobizide Stoffe als Reaktion auf die Anwesenheit

bzw. Vermehrung der Parasiten von Zellen geschaffen und aufgespeichert werden, und dafs auch hier mit der mikrobiziden Eigenschaft dieser Stoffe eine hämolytische eng verbunden ist. Diese letztere tritt bei Schwarzwasserfieber in den Vordergrund und zeigt an, dafs, wenn dieses spontan eingetreten ist, die Konzentration der Antikörper einen Grad erreicht hat, bei dem gleichzeitig mit der Parasitenvernichtung eine ausgedehnte Hämolyse erfolgen mufs, also genau so, wie es die Beobachtungen an trypanosomenkranken Tieren ergeben haben.

In allen den Fällen, wo kurz nach Verabreichung von Chinin oder ähnlichen Medikamenten Schwarzwasser entstanden ist und mit ihm die Malariaparasiten ganz oder fast ganz verschwunden sind, ist anzunehmen, dafs dieser Konzentrationsgrad der reaktiven Stoffe, spontan wenigstens, bisher nicht erreicht wurde, sondern dafs erst durch das Hinzutreten der in der gleichen Richtung sich erstreckenden Chininwirkung die Bedingungen für das Entstehen der Hämoglobinurie erfüllt wurden. Damit soll natürlich nicht gesagt sein, dafs auch ohne das Chinin, nur später, die Hämolyse mit derselben Heftigkeit hätte eintreten müssen.

Wesentlich seltner sind die Fälle, bei denen mit dem Schwarzwasseranfall keine deutliche Verminderung der Parasiten Hand in Hand geht. Über diese Ausnahmefälle auf sichere Beobachtungen gestützte Erklärungen aufzufinden, ist mir bisher nicht möglich gewesen. Doch scheint es, als ob in einem Teil die besonders hochgradige Schwäche des Organismus eine normale Anhäufung von Immunkörpern während der Malariaanfälle hat vermissen lassen, da unter diesen Bedingungen ebenso wie die andern Funktionen des Körpers auch die Fähigkeit gelitten haben mufs, in ausreichendem Mafse Schutzstoffe gegen Kranheitserreger zu produzieren; anderseits zeigen Fälle wie der von Schlayer veröffentlichte, dafs unter Umständen gleich nach dem ersten Malariaanfall Schwarzwasserfieber einsetzen kann, also zu einer Zeit, in der man die Aufspeicherung antiparasitärer Stoffe in irgendwie erheblicher Menge noch nicht zu vermuten berechtigt ist (vorhergehender, längerer, das Fieber vollkommen

hintanhaltender Chiningebrauch, nach Aussetzen erstes Fieber in der Heimat, auf 0,75 Phenazetin Hämoglobinurie).

Bei der einfachen Malaria treten Hämolyse und Parasitenvernichtung nicht in dem Mafse hervor wie beim Schwarzwasserfieber; doch wissen wir, dafs mit jedem Anfall, dessen Beginn bekanntlich mit der Schizogonie zeitlich zusammenfällt, eine mehr oder minder weitgehende Zerstörung von roten Blutkörperchen verbunden ist, und ferner, dafs dieselbe nicht von der Menge der vorhandenen Parasiten abhängt, sondern eventuell bedeutende Dimensionen annehmen kann, ohne dafs die Zahl der Parasiten eine grofse sein braucht, und umgekehrt.

Nun ist allerdings mit dem Fieberanfall ein Verschwinden der Parasiten meistens nicht verknüpft, und doch müssen wir annehmen, dafs ein grofser Teil derselben während der Hämolyse zugrunde geht, da sonst nach der Schizogonie stets eine ganz gewaltige Vermehrung der Parasiten erwartet werden müfste. Wo eine stärkere Vermehrung der Parasiten angetroffen wird, wie z. B. bei den beiden oben erwähnten Kochschen Fällen, ist dies nach meiner Ansicht in derselben Weise durch einen abnorm schwachen Organismus zu erklären, wie es eben im Anschlufs an die Besprechung des Schwarzwasserfiebers geschehen ist.

Ich nehme also auch beim einfachen Malariaanfall die Bildung eines zugleich antiparasitär und hämolytisch wirkenden Körpers innerhalb von Zellen an, dessen Anhäufung während weiterer Fieberanfälle allmählich zu einer immer mehr ausgesprochenen Immunität den Parasiten gegenüber führen mufs.

Unter Berücksichtigung dieser Anschauung erscheint mir deshalb der Malariaanfall von dem Schwarzwasseranfall nur graduell verschieden, mag dieser spontan oder auf eine Chiningabe hin eingetreten sein, sofern nur eine deutliche Verminderung der Parasitenzahl zu konstatieren ist; denn der mäfsigen Parasitenzerstörung und gleichzeitigen mäfsigen Hämolyse des ersteren entspricht hier die Kombination der gleichen nur weitergehenden Reaktionen. Es liegt daher für mich nahe, die Disposition für Schwarzwasser mit einer höheren Virulenz der Parasiten in Ver-

bindung zu bringen, wie es auch Stephens getan hat; mit diesem wesentlichen Punkte würden sich auch leicht die Hypothesen vom Einfluß des Klimas (Koch) und der Übertragung durch bestimmte Mückenarten (F. Plehn), sowie die Änderung der Konstitution der in Schwarzwasserbezirken lebenden Europäer (Stephens) in einen kausalen Zusammenhang bringen lassen.

Was die Hämolyse anbetrifft, so ist auch Panse auf Grund seiner Beobachtungen an 35 Schwarzwasserkranken über das Verhältnis vom Schwarzwasser zur Malariainfektion zum gleichen Resultat gelangt: »Sobald feststeht, daß Erythrocytolyse mit konsekutiver Hämoglobinämie zum Wesen der Malariainfektion gehört, wäre demnach die Folgerung möglich, daß Schwarzwasserfieber nichts anderes zu sein braucht, als ein auf Grund höherer Intensität der Infektion erreichter höherer Grad jener Erythrocytolyse. Dann würden wir dem Chinin und anderen Medikamenten, deren zweifellosen Einfluß keine Überlegung je mehr außer acht lassen darf, nur noch die Fähigkeit zuschreiben dürfen, Steigerungen der »Malariahämocytolyse« zu unterstützen, zu begünstigen, nicht aber die Fähigkeit, eine Hämocytolyse bei Malaria überhaupt erst »hervorzurufen«, zu »veranlassen« oder »auszulösen«.«

Es erübrigt noch auf die Beobachtungen einzugehen, die sich mit der Diagnose der Disposition für Schwarzwasserfieber beschäftigen. Koch hat als Symptome dafür das Ansteigen der Temperatur in den nächsten Stunden nach einer Chiningabe auf 38° und darüber, auffallendes Dunklerwerden des Urins und eine am nächsten Morgen sich zeigende ikterische Verfärbung der Haut angegeben. Ruge konstatierte in einem Fall auf 0,3 Chinin subkutan eine bedeutende Vermehrung der polychromatischen Erythrozyten und einige Tage später auf dieselbe Dosis einen Schwarzwasseranfall; er hielt es deshalb für berechtigt darauf hinzuweisen, daß vielleicht durch derartige Blutbefunde eine drohende Hämoglobinurie erkannt werden könnte. Da die Polychromasie ebenso wie der Kochsche Symptomenkomplex stets ein Ausdruck dafür ist, daß nicht unbeträchtliche Mengen von roten Blutkörperchen zugrunde gegangen sein

müssen, da ferner eine Zählung der polychromatischen Erythrozyten nach meinen Erfahrungen am Blut mit Trypanosomen infizierter Tiere insofern auf Schwierigkeiten stöfst, als die Färbung nicht immer gleichmäfsig deutlich ausfällt, und bei einer gewissen Menge von Blutscheiben nicht sicher entschieden werden kann, ob sie zu den orthochromatischen oder zu den polychromatischen zu rechnen sind, so möchte ich eine Modifizierung des Rugeschen Vorschlags durch die einwandsfreiere Blutkörperchenzählung vor und nach der Chiningabe empfehlen. Vielleicht gelingt es so, in der Praxis einen ungefähren Grenzwert der Differenzen festzustellen, der die drohende Schwarzwassergefahr anzeigt und damit die weitere Verabreichung von Chinin, wenigstens in derselben Dosis, verbietet.

Es liegt nahe, nachdem sich in dem Verhalten der Parasiten zur Blutkörperchenzerstörung eine prinzipielle Übereinstimmung zwischen Trypanosomiasis und Malaria ergeben hat, den Vergleich auch auf die Piroplasmosen, die ja durch die häufig bei ihnen auftretende Hämoglobinurie charakterisiert sind, auszudehnen.

Auch bei den Piroplasmosen, z. B. der Hämoglobinurie der Rinder, verschwinden mit den Bluthamen meist ziemlich akut die Parasiten vollständig oder bis auf vereinzelte Exemplare; nur bedarf es dazu einer weit reichlicheren Ansammlung von Parasiten als bei der menschlichen Malaria. Der Verlauf der Piroplasmose steht daher bis auf die bei Trypanosomeninfektionen bisher nicht beobachtete Hämoglobinurie diesen näher als dem Schwarzwasser Malariakranker. Häufig tritt noch nach dem Verschwinden der Piroplasmen dadurch, dafs die Hämolyse noch weiter fortschreitet, der Tod ein. Diese hier spontane Erscheinung erinnert lebhaft an Beobachtungen, die ich bisweilen an caderas- oder naganakranken Mäusen, die mit Trypanrot behandelt waren, machen konnte; die Tiere gingen noch nach der vollkommenen Heilung von der Infektion an der weiter zunehmenden Anämie ein. Derartige Befunde beweisen aber meines Erachtens, dafs auch bei den Piroplasmosen die Erythrozytolyse im wesentlichen nicht durch eine unmittelbare Einwirkung der Parasiten auf die Blutkörperchen hervorgerufen wird, sondern dafs dieser Prozefs

hier in der gleichen Weise einen indirekten Verlauf nimmt und ebenso mit der Bildung von mikrobiziden Stoffen eng verknüpft ist wie bei der Trypanosomiasis und der menschlichen Malaria bzw. dem Schwarzwasserfieber bei menschlicher Malaria.

Literatur.

Daniels, Royal Society. Reports to the Malaria Committee, 1901, V. Series.

v. Dungern, Spezifisches Immunserum gegen Epithel. Münchner med. Wochenschr., 1899, Bd. 46.

Kolle und Wassermann, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen.

Kleine, Über Schwarzwasserfieber. Zeitschrift f. Hygiene und Infektionskrankheiten, Bd. 38, 1901.

Koch, Über Schwarzwasserfieber (Hämoglobinurie). Zeitschrift f. Hygiene und Infektionskrankheiten, Bd. 30, 1899.

Kossel, Schütz, Weber und Mießner, Über die Hämoglobinurie des Rindes in Deutschland. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. 20, 1903.

Krönig, Phenacetinvergiftung mit tödlichem Ausgang. Berliner klin. Wochenschr., 1895.

Kunkel, Handbuch der Toxikologie. Jena, 1901.

Moffat, Blackwater fever. Brit. med. Journ., 1902, Vol. I, Nr. 2143.

Nißle, Beobachtungen am Blut mit Trypomosomen geimpfter Tiere. Archiv f. Hygiene, Bd. 53, 1905.

Otto, Ein in unseren Breiten erworbener Fall von Schwarzwasserfieber bei Quartana. Deutsche med. Wochenschr., 1902.

Panse, Schwarzwasserfieber. Zeitschrift f. Hygiene und Infektionskrankheiten, Bd. 42, 1903.

Plehn, A., Ätiologie und Pathogenese des Schwarzwasserfiebers. Virchows Archiv, Bd. 174, 1903 und Deutsche med. Wochenschr., 1903.

Plehn, F., Über die praktischen Ergebnisse der neueren Malariaforschung und einige weitere Aufgaben derselben. Deutsche med. Wochenschr., 1901.

Ruge, Einführung in das Studium der Malariakrankheiten, 1901.

Ruge, Ein Beitrag zur Ätiologie des Schwarzwasserfiebers. Deutsche med. Wochenschr., 1902.

Schlayer, Beitrag zur Kasuistik der Malaria und des Schwarzwasserfiebers. Deutsche med. Wochenschr., 1902.

Stephens, Blackwater fever. Thompson Yates and Johnston laboratories report. Vol. V, 1903, Nr. 1. (Ref. Zentralblatt f. Bakteriologie, 1904).

Über den Einflufs des Hungers auf die Bakteriendurchlässigkeit des Intestinaltraktus.

Von

Prof. **M. Ficker.**

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin. Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. M. Rubner.)

Wenn man berücksichtigt, mit wieviel Unbekannten wir bei experimentellen Untersuchungen über die Entstehungsweise intestinaler Infektionen zu rechnen haben, so kann es nicht wundernehmen, dafs unsere Kenntnisse über diese Frage heute noch nicht weiter gediehen sind. Solange z. B. die Rolle der Darmsäfte oder der im Darme heimischen Mikroorganismen gegenüber infektiösen Keimen nicht eingehender untersucht ist oder solange wir über die Virulenzabschwächung und -Verstärkung, wie sie unter natürlichen Verhältnissen erfolgt, nicht besser unterrichtet sind oder solange wir den Begriff der Disposition, der so Verschiedenartiges zusammenfafst und so oft herhalten mufs, um Unbekanntes zu verbergen, mit spezieller Rücksichtnahme auf die Infektion vom Darme aus nicht zergliedern und schärfer präzisieren, wird es schwer fallen, Gesetze von allgemeinerer Gültigkeit aufzustellen.

Um eine Grundlage für Untersuchungen in der in Rede stehenden Richtung zu gewinnen, habe ich, wie früher mitgeteilt (1), bei Innehaltung einer bestimmten Methodik das Verhalten des normalen Darms von Tieren gegenüber einverleibten Saprophyten

und den normalen Darmkeimen geprüft. Da mir so bei einheitlicher Versuchsanordnung die Verhältnisse bei bestimmten Tiergattungen bekannt waren, legte ich mir, um einen Schritt weiter zu kommen, die Frage vor, ob an diesem normalen Verhalten etwas geändert wird, wenn solche Einflüsse, wie sie bei der Entwicklung von Darminfektionen in Betracht zu kommen scheinen, auf die Versuchstiere einwirken würden: nach Variation dieser Bedingungen könnte sich bei Prüfung des Blutes und der Organe eines Versuchstieres auf verfütterte, leicht wieder erkennbare Saprophyten oder auf Darmbakterien vielleicht beobachten lassen, ob lediglich den geprüften Faktoren eine Bedeutung für den Übertritt von Bakterien aus dem Darm beizumessen sei. Bei solchen Versuchen würde der Vorteil gegeben sein, dafs aus der Gleichung zunächst die komplizierende Frage der Infektion bzw. Virulenz ausgeschaltet ist.

Es erschien in dieser Beziehung der Einflufs des Hungers der Untersuchung wert.

I. Versuche.

Die Versuche erstreckten sich auf Kaninchen, Hunde, Katzen, Mäuse und Ratten. Nur den Hunden wurde Wasser verabreicht, die übrigen Tiere wurden unter kompletter Abstinenz gehalten. Für Reinhaltung der Käfige wurde Sorge getragen, erfahrungsgemäfs wird z. B. bei Feuchtsitzen der Hunger sehr schlecht ertragen. — Die Versuchsanordnung war im übrigen dieselbe, wie sie in dieser Zeitschrift Bd. 52, S. 180 ff. geschildert wurde.

Bei Versuch 1—4 wurden nur diejenigen Kulturröhrchen näher untersucht, bei denen ein Kulturwachstum an der Oberfläche in roter Farbe erfolgte. Das Aufbewahren der Röhrchen geschah bei 27°. Diejenigen Gläser, bei denen nach 14 Tagen anscheinend kein Wachstum oder eine farblose Vegetation auftrat, wurden vernachlässigt. Bei den übrigen Versuchen wurden alle getrübten Röhrchen und Kolben untersucht, die gefundene Stäbchenart, sofern sie nicht der Heubazillengruppe angehörte, wurde weiter identifiziert. Die klar gebliebenen Kulturgläser oder diejenigen, die Kokken, Sarcinen oder Hefen enthielten, blieben aufser weiterer Beachtung. Versuche an Hunden, bei denen Askariden gefunden wurden, sind nicht mitaufgeführt.

1. Kaninchen gelb, 2280 g, hungert 6 Tage. Darnach Verfütterung von Rotem Kieler (Agarbelag einer Schale von 16 cm Durchmesser, 20 Stunden bei 27° gewachsen) mit Rüben. Nach $3^2/_4$ Stunden stranguliert. Roter Kieler

vorhanden in 2 Leberröhrchen, 1 Blutröhrchen, im Dünndarm bis zum Cöcum reichlich, im Dickdarm sehr vereinzelt.

2. Kaninchen grau, 2230 g, hungert 4 Tage. Darnach Verfütterung von Rotem Kieler (Agarbelag einer Schale von 16 cm Durchmesser, 16 Stunden 27°) mit Kohlrabi. Nach 4 Stunden stranguliert. Roter Kieler nachweisbar in 1 Leber, 1 Milz- und 1 Blutröhrchen, ebenso in der ganzen Länge des Darmkanals.

3. Kaninchen grau, 1960 g, hungert 3 Tage, erhält vom Roten Kieler 1 Agarplattenbelag (16 cm Durchmesser, 16 Stunden 27°) mit Kohlrabi. Nach $4^1/_2$ Stunden stranguliert. Roter Kieler nachweisbar in 1 Leber-, 1 Milz- und 1 Mesenterialdrüsenröhrchen, ebenso in der ganzen Länge des Darmkanals.

4. Kaninchen grau, 1980 g, hungert 2 Tage, erhält 1 Agarplattenbelag Roten Kieler zwischen Kohlrabi wie Tier 3. Nach $4^1/_2$ Stunden stranguliert. Roter Kieler im ganzen Darmtraktus nachweisbar, sonst nirgends.

5. Kaninchen weifs, 2120 g, hungert 7 Tage, erhält mit Runkelrüben 1 Platte Roten Kieler (9 cm Durchmesser, 1 Tag, 27°). Nach 4 Stunden stranguliert. I. Kulturkolben mit 250 ccm Bouillon. a) Leber: von 4 Kolben enthält 1 Roten Kieler, aufserdem Proteus, b) Niere: 1 Kolben, enthält Roten Kieler, c) Herzblut: 2 Kolben steril, 1 enthält Roten Kieler. II. Kulturröhrchen. a) Leber: von ca. 60 Röhrchen enthalten 12 Roten Kieler, 1 fluorescens liquefaciens, 15 Bact. coli, 6 Proteus, b) von 12 Nierenröhrchen enthalten 2 Roten Kieler, c) Mesenterialdrüsen: von 11 Röhrchen enthalten 3 Bact. coli, 1 Roten Kieler, d) Blut: 14 steril.

6. Kaninchen grau, 2510 g, hungert 6 Tage, erhält 1 Agarplatte (8,9 cm Durchmesser, 1 Tag, 27°) Roten Kieler mit Rüben. Nach $3^3/_4$ Stunden stranguliert. I. Kolben. a) Leber: 4 Kolben beschickt, davon enthalten 2 Bact. coli, 1 Roten Kieler, 1 steril, b) Herzblut: 1 Kolben steril. II. Röhrchen. a) Leber: von 43 Röhrchen enthält 1 Bact. coli, b) Blut: von 29 Röhrchen enthält 1 Roten Kieler, c) Nieren: alle 11 Röhrchen steril, d) Milz: von 9 Röhrchen enthält 1 Roten Kieler, e) Mesenterialdrüsen: von 14 Röhrchen enthalten 2 Bact. coli.

7. Kaninchen gelb, 2640 g, hungert 6 Tage. Stranguliert ohne vorherige Fütterung. I. Kolben. Leber: von 3 Kolben verbleiben 2 steril, 1 enthält B. coli. II. Röhrchen. a) Leber: von 25 Röhrchen enthalten 3 B. coli, b) Blut: 26 Röhrchen geimpft, sämtlich steril, c) Mesenterialdrüsen: 14 Röhrchen geimpft, 1 enthält B. coli, d) Milz: alle 9 Röhrchen steril, e) Nieren: alle 15 Röhrchen steril.

8. Kaninchen weifs, 2890 g, hungert 8 Tage, darnach stranguliert ohne vorherige Fütterung. I. Kolben. Leber: 3 Kolben. Davon enthält Nr. 1 Proteus, Nr. 2 B. coli und Proteus, Nr. 3 steril. II. Röhrchen. a) Leber: von 48 Röhrchen enthalten 5 B. coli, b) Blut: 16 Röhrchen, davon enthalten 3 Proteus, c) Mesenterialdrüsen: von 7 Röhrchen enthält 1 B. coli, d) Milz: alle 8 Röhrchen steril, e) Nieren: alle 13 Röhrchen steril.

9. Hund, Fox, 8,5 kg, erhält nach 8 Tage langem Hungern 0,5 kg gewiegtes Pferdefleisch, vermischt mit 3 Agarplatten (9 cm Durchmesser, 1 Tag 27°) Roten Kieler. Nach 3 Stunden mit Nikotin vergiftet. Starke Schaum-

bildung am Maul und wiederholte tiefe Inspirationen vor dem exitus. Resultat: Alle Lungenröhrchen enthalten Roten Kieler, ebenso der Darm bis zum Cöcum. In den Organen, im Blut und in Mesenterialdrüsen: 0 Roter Kieler.

10. Hund gelb, »Fuchs«, 13,5 kg, hungert 12 Tage. Gewichtsabnahme 1,73 kg. Erhält mit 0,5 kg Hackfleisch 3 Agarplatten Roten Kieler (9 cm Durchmesser, 1 Tag 27°). Nach $3^1/_2$ Stunden entblutet von rechter Karotis aus. Resultat: a) Leber: beschickt 52 Röhrchen, davon enthält 1 B. coli, 1 Proteus, b) Blut: 21 Röhrchen, alle steril, c) Milz: 11 Röhrchen, alle steril, d) Nieren: 19 Röhrchen, alle steril, e) Mesenterialdrüsen: 14, davon in 2 B. coli. — In keinem Röhrchen Roter Kieler. Im Dünndarm reichliche Mengen, im Cöcum und weiter nach abwärts etwa 4—5 % Kolonien von Rotem Kieler.

11. Teckel, 6,1 kg, braun, hungert 13 Tage. Erhält 0,5 kg Pferdefleisch mit 2 Platten (9 cm Durchmesser, 1 Tag 27°) Roten Kieler. Nach 4 Stunden von rechter Karotis aus entblutet. Resultat: a) Leber: beschickt 76 Röhrchen, davon enthalten 3 B. coli, 4 Proteus, b) Milz: 6 Röhrchen, alle steril, c) Nieren: 12 Röhrchen, davon 1 B.coli, d) Mesenterialdrüsen: 11 Röhrchen, davon 2 B. coli, e) Blut: 23 Röhrchen, alle steril. — In keinem Röhrchen Roter Kieler nachweisbar. Der Dünndarm enthält massenhaft Roten Kieler. Vom Cöcum nach abwärts nur noch 5—10 % neben den üblichen Darmbakterien.

12. Terrier, 9,2 kg, hungert 16 Tage. Erhält mit 0,5 kg Pferdefleisch 3 Platten Roten Kieler (Agar, 9 cm Durchmesser, 1 Tag 27°). Nach $4^3/_4$ Stunden entblutet. Resultat: a) Leber: beschickt 70 Röhrchen, davon enthalten Roten Kieler 3 Röhrchen, B. coli 5, Proteus 1, b) Milz: 5 Röhrchen, sämtlich steril, c) Nieren: 8 Röhrchen, davon 1 Proteus, d) Mesenterialdrüsen: 10, davon 1 Roten Kieler, 2 B. coli, 1 Proteus, e) Blut: 34 Röhrchen, davon 1 Roten Kieler. Im Dünndarm reichlich Roter Kieler, im Cöcum und weiter abwärts ca. 5 % Kolonien von Rotem Kieler unter Darmbakterien.

13. Spitz, 7,3 kg, hungert 17 Tage. Erhält mit 0,5 kg Pferdefleisch 3 Platten Roten Kieler wie 12. Nach $4^1/_2$ Stunden entblutet. Resultat: a) Leber: beschickt ca. 60 Röhrchen, davon enthalten 4 Roten Kieler, 2 B. coli, b) Milz: 6 Röhrchen, alle steril, c) Nieren: 7 Röhrchen, alle steril, d) Mesenterialdrüsen: 13 Röhrchen, davon 2 Roten Kieler, 1 B. coli, 1 Proteus, e) Blut: 37 Röhrchen, sämtlich steril. In der ganzen Länge des Darmkanals Roter Kieler, vom Cöcum abwärts ca. 5—10 % neben Darmbakterien.

14. Katze, grau-weifs, 2300 g, hungert $3^1/_2$ Tage. Erhält darnach mit $^1/_2$ Pfund Hackfleisch 2 Petrischalen (8,9 cm Durchmesser, 18 Stunden 27°) Roten Kieler. Nach 3 Stunden entblutet von rechter Karotis aus. Resultat: Roter Kieler in 2 Röhrchen von Leber, ebenfalls in 2 Röhrchen von Mesenterialdrüsen. B. coli in einem Röhrchen von Mesenterialdrüsen.

15. Katze, schwarz, 2400 g, hungert 5 Tage. Ohne vorherige Fütterung von rechter Karotis aus entblutet. Resultat: a) Leber: geimpft 65 Röhrchen, davon weisen 3 B. coli, 1 Proteus auf, b) Mesenterialdrüsen: 12 Röhrchen, davon in 1 B. coli, c) Blut: 39 Röhrchen, alle steril.

16. Katze, grau, 2160 g, hungert 6 1/2 Tag. Ohne vorherige Fütteruug entblutet. Resultat: a) Leber: 61 Röhrchen, davon in 8 B. coli, in 2 B. coli + Proteus, b) Mesenterialdrüsen: 6 Röhrchen, davon in 3 B. coli, in 1 B. coli + Proteus, c) Milz: 5 Röhrchen, davon in 1 B. coli, d) Nieren: 5 Röhrchen, alle steril, e) Blut: 34 Röhrchen, davon in 5 B. coli, in 2 B. coli + Proteus.

17. Maus 1, hungert 3 Tage, darnach stranguliert. B. coli ist enthalten in 21 Röhrchen von Leber, in 4 von Milz, in 1 von Herzblut. Steril sind 19 Röhrchen von Leber, alle 6 von Nieren, 1 von Milz.

18. Maus 2, hungert 30 Stunden. 3 Röhrchen von Leber enthalten B. coli, 1 Proteus. Die übrigen 13 Röhrchen von Leber, 7 von Blut, 5 von Niere, 3 von Milz, 4 von Lunge sind steril.

19. Maus 3, hungert 16 Stunden, darnach stranguliert. Beschickt werden 16 Röhrchen mit Leber, 9 mit Nieren, 3 mit Milz, 3 mit Blut, 4 mit Lunge. Sämtliche Röhrchen steril.

20. Maus 4, hungert 30 Stunden. Darnach Verfütterung von 5 Ösen Roten Kielers (20 Stunden alte Agarkultur, 27°), vermischt mit Semmel. Nach 3 3/4 Stunden stranguliert. Roter Kieler in 2 Leber- und 1 Blutröhrchen. B. coli in 3 Leberröhrchen. Steril sind 8 Röhrchen von Leber, 4 von Blut, 4 von Nieren, 2 von Milz, 3 von Lunge.

21. Ratte 1, weifs, 240 g, hungert 6 1/2 Tage, darnach stranguliert. B. coli enthalten 14 Röhrchen von Leber, 5 von Nieren, 4 von Mesenterialdrüsen. Steril sind 7 von Blut, 15 von Leber, 3 von Mesenterialdrüsen, 2 von Lunge, 4 von Bronchialdrüsen, 8 von Nieren, 5 von Milz.

22. Ratte 2, weifs, 265 g, hungert 5 Tage, darnach stranguliert. B. coli enthalten 2 Röhrchen von Leber, 1 von Mesenterialdrüsen, 1 von Blut. Steril sind 26 Röhrchen von Leber, 6 von Nieren, 4 von Milz, 4 von Mesenterialdrüsen, 8 von Blut, 4 von Lunge.

23. Ratte 3, weifs, 255 g, hungert 2 Tage, darnach stranguliert. Geimpft werden 24 Röhrchen von Leber, 9 von Blut, 8 von Nieren, 5 von Milz, 4 von Mesenterialdrüsen, 5 von Lunge. In keinem Röhrchen sind Darmkeime nachzuweisen.

II.

Der Einflufs des Hungers trat mir zum ersten Male deutlich zutage, als ich in früheren Versuchen jungen Kaninchen nicht sofort nach der Herausnahme aus dem Nest die Keimaufschwemmung verabreichte, sondern die Tiere erst einige Zeit von der Mutter absetzte, um nach dieser Hungerperiode eine vollständigere Aufnahme der im Saugfläschchen dargebotenen Kulturdosis zu erreichen. Bei der kulturellen Untersuchung des Blutes und der Organe der Hungertiere war stets in einer gröfseren Anzahl von Röhrchen der verfütterte Keim nachzuweisen wie bei den Kontrolltieren. Indessen sind die Resultate dieser Versuche, die ja

dieser Fragestellung gar nicht dienen sollten, vielleicht im Zusammenhange mit den anderen, hier mitzuteilenden verwertbar, für eine exakte Klarlegung sind sie nicht ausreichend; es hätte dazu einer quantitativ genauen Zerlegung des Organismus und einer Verteilung auf entsprechende Nährbodenmengen zum Gewinnen vergleichbarer Ergebnisse bedurft. Bei der an und für sich so hohen Empfindlichkeit des Magendarmtraktus jugendlicher Kaninchen erschien es mir vielmehr richtiger, erwachsene Kaninchen hungern zu lassen, um sie sodann mit Rotem Kieler zu füttern und darnach Blut und Organe kulturell zu untersuchen.

Wie aus den Versuchen hervorgeht, konnten bei sämtlichen erwachsenen Kaninchen, die 3—7 Tage gehungert hatten und dann mit dem Futter Roten Kieler erhielten, die verfütterten Keime in Organen oder im Blut nachgewiesen werden. Da bei nicht hungernden Kaninchen unter Innehaltung der im übrigen gleichen Versuchsanordnung nur in 35% der Fälle ein Übertritt verfütterter Mikroorganismen beobachtet worden war(1), so kommt hier schon zum Ausdruck, dafs die Schutzvorrichtungen gegenüber dem Eindringen von per os aufgenommenen Keimen bei Nahrungsentziehung in ihrer Funktion beeinträchtigt werden.

Bei diesen Fütterungsversuchen am hungernden Kaninchen fiel mir bald auf, dafs gegenüber den Befunden bei normalen Kaninchen bei weitem mehr von denjenigen Röhrchen, in denen nicht Roter Kieler angegangen war, fremde Keime enthielten; die nähere Untersuchung ergab, dafs es sich hierbei vor allem um Bact. coli, B. lactis aërogenes, Proteus und Bazillen aus der Subtilis-Gruppe handelte. Es erschien mir daher für weitere Versuche am Kaninchen nicht nur überflüssig, eine Keimverfütterung vorzunehmen, sondern auch rätlich, die Keimzufuhr wegzulassen und vielmehr die Organe des Hungertieres auf Darmkeime zu untersuchen. Gegen die Versuche mit Keimverfütterung kann ja der Einwand erhoben werden, dafs man damit, selbst wenn man Saprophyten wählt, doch auch die Stoffwechselprodukte dieser Mikroorganismen, die nicht indifferent sein könnten, einführt. Da man nun mit Hinblick auf die grofse

Oberfläche, auf welche sich die verfütterten und in den Säftekreislauf eindringenden Keime verteilen, kulturell einen Ausschlag nur erwarten darf, wenn man die Keimdosis nicht zu gering bemifst, so besteht darin vielleicht die Gefahr, dafs die Einfuhr solchen Materials direkt Schleimhautalterationen veranlassen könnte. Man müfste freilich dann auch zugeben, dafs ähnliche Alterationen schon durch viele unserer Nahrungsmittel hervorgerufen werden müfsten, die massenhafte Bakterien und deren Stoffwechselprodukte enthalten, so Milch, Butter, Käse, Hackfleisch, Wurst usf., gar nicht zu reden von den Bakterienmassen, die das Tierfutter enthält.

Um alle Bedenken zu zerstreuen, habe ich in einer Anzahl von Versuchen die Verfütterung von Reinkulturen aufgegeben und eine kulturelle Untersuchung des hungernden Organismus auf Darmkeime vorgenommen.

Um Darmbakterien in den Organen nachzuweisen, ist die Kenntnis der Bakterienflora des Darmes und der Luft des Untersuchungsraumes nötig. Die konstanten Bewohner des Kaninchendarmes sind Bazillen aus der Koli-, Proteus- und Subtilis-Gruppe. Zur Koli-Gruppe rechne ich im folgenden auch den B. lactis aerogenes mit Verwandten. Die eingehenden Luftuntersuchungen, die ich nun schon längere Zeit hindurch und bei jedem Tierversuch aufs neue in dem Arbeitsraum durch Exponieren von Luftplatten (vgl. diese Zeitschr. Bd. 52, S. 182) vornehme, habe ich dahin erweitert, dafs ich mehrfach mitten im Versuch oder am Anfang und Ende an Bouillonröhrchen Kontrollimpfungen mit Rindsleber vornahm, die im Autoklaven bei 112° 1 Stunde sterilisiert und mit denselben Manipulationen wie die Organe des Versuchstiers verarbeitet wurde. Aus allen Luftuntersuchungen ergab sich, dafs Koli- und Proteus-ähnliche Keime nicht in der Luft, hingegen dann und wann Heubazillen oder ihm Nahestehende vorkamen. Es wurde daher das Augenmerk zunächst nur auf B. coli und Proteus gerichtet.

Es ergeben nun die Versuche, dafs in der Tat bei erwachsenen Kaninchen im Hungerzustande Darmbakterien in den Organen und im Blute zu finden sind.

Ein zutreffendes Bild von der Verteilung der Darmbakterien oder der verfütterten Keime auf die einzelnen Organe zu geben, bin ich zunächst nicht imstande, da es unmöglich erschien, den Gesamtorganismus kulturell abzusuchen. Es kommt eben, wie ich schon früher ausgeführt habe, für die Methodik der kulturellen Untersuchung von Blut und Organen ganz besonders darauf an, das Mengenverhältnis zwischen Organmasse bzw. Blut und Nährboden zu berücksichtigen. Fernerhin mufs für ausreichende Aufschliefsung des Organs gesorgt werden. Es ist ganz falsch zu glauben, dafs vereinzelte mit Organstücken in Bouillon übertragene Keime unter allen Umständen hier nachgewiesen werden können: so mufs das Kulturverfahren auf den Nachweis der toten Bakterien verzichten; da wir ferner bei der Einsaat von irgendwelchem Kulturmaterial in ein anderes Nährsubstrat einen anfänglichen Rückgang der Keimzahl beobachten, so mufs angenommen werden, dafs, wenn vereinzelte, in abgeschwächter Verfassung befindliche Mikroorganismen aus dem Organ in Bouillon übertragen werden, solche überhaupt nicht zum Auskeimen zu kommen brauchen. Aber man mufs noch weiter gehen: Die in ein Bouillonröhrchen gegebenen Organstücke verfallen der Autolyse. Hierbei werden, wie ich in mehreren, bei anderer Gelegenheit zu publizierenden Versuchen festgestellt habe, nicht nur entwicklungshemmende Produkte frei, sondern wir haben es dabei auch mit deutlich bakteriziden Stoffen zu tun, deren Existenz schon H. Conradi(2) feststellte. Die Beobachtung dieser Tatsache bei meinen Versuchen ist insofern nicht ohne Wert, als hierbei die sonst bei autolytischen Versuchen üblichen antiseptischen Zusätze niemals zur Anwendung kamen. Auch nach meinen Erfahrungen ist von allen Organen die Leber zum Studium der autolytischen Vorgänge am geeignetsten und zwar Kaninchen- und Hundeleber. Bei 37° war oft nach 2 Tagen, bei 27° nach 3—5 Tagen in zahlreichen Leberröhrchen eine intensive Schaumbildung wahzunehmen; die vom Boden des Röhrchens aufsteigenden Bläschen rissen oft ganze Leberstücke mit in die Höhe. In manchen Fällen war die Gasbildung eine so starke, dafs Leberstücke bis zum Watte-

stopfen hinaufgeschleudert wurden. Hierbei war sowohl im direkten mikroskopischen Präparate als auch im Kulturversuch mit kleineren und gröfseren Quantitäten der gärenden Flüssigkeit oder der Organstückchen unter Variierung der Nährböden (Bouillon, Gelatine, Agar, Kartoffel) in vielen Fällen Keimfreiheit, sofern wir bei Anwendung der jetzt üblichen Methoden davon sprechen dürfen, zu konstatieren. In allen diesen Röhrchen war Schwefelwasserstoff nachweisbar. Die Stärke der in den sterilen Bouillonröhrchen auftretenden Gasentwicklung hing von der Menge der Einsaat von Lebermasse ab. Bei einzelnen Tieren ergaben sich merkwürdige Verschiedenheiten, die ich nicht aufzuklären vermochte. Die geringste Gasbildung trat bei Leber von Tieren ein, die längere Zeit hungerten. Es stimmt das mit den Beobachtungen E. Schlesingers(³) überein, der durch Bestimmung der Zunahme des nicht koagulablen Stickstoffs die Wirkungsintensität des autolytischen Ferments bei atrophischen Kindern stark vermindert fand.

Wenn nun, wie erwiesen, bei den autolytischen Vorgängen antiseptische oder bakterizide Stoffe die mit den Organpartikeln übertragenen Keime in der Entwicklung ganz oder eine Zeitlang hindern, so ergibt sich daraus für unsere Untersuchungstechnik die Forderung, die Kulturgläser öfters und längere Zeit hindurch zu beobachten, sowie möglichst wenig von dem Organmaterial und dieses im aufgeschlossenen Zustande den Bouillonröhrchen zu übergeben. Wollte man unter Berücksichtigung dieser Momente den Gesamtorganismus von gröfseren Versuchstieren durch das kulturelle Verfahren auf Keime untersuchen, so würde man das nur unter weitgehender Arbeitsteilung tun können, um in kurzer Zeit die Impfungen zu vollziehen. Damit aber würde die Vergleichbarkeit der Resultate wieder in Frage gestellt. Ich habe mich daher darauf beschränkt, bei Kaninchen etwa den sechsten, bei Katzen und Hunden etwa den zehnten Teil der Organe auf Nährböden auszusäen. Rechnet man das alles zusammen, so mufs man die in den Versuchen erhaltenen positiven Resultate als ein Minimum ansehen, in Wirklichkeit sind die verfütterten

Keime bzw. die Darmbakterien in den Organen in gröſserer Zahl vorhanden gewesen.

Als ein noch geeigneteres Versuchstier wie das Kaninchen muſs für das Studium der den Übertritt von Darmkeimen begünstigenden Faktoren der Hund erscheinen: selbst nach Verfütterung groſser Quantitäten von saprophytischem Bakterienmaterial konnte in meinen früheren Versuchen der verfütterte Keim beim normalen Hund im Blut oder in den Organen niemals nachgewiesen werden. Gelingt es, beim Hunde Bedingungen zu schaffen, welche den im Darmlumen befindlichen Keimen ein Eindringen in Blut- und Lymphbahnen und in die Organe ermöglichen, so müſste bei der hohen sonstigen Widerstandsfähigkeit des Intestinaltraktus des Hundes einem solchen Moment in der Tat eine gewichtige Rolle bei der Entstehung von Darminfektionen zuzuerkennen sein.

In den Hungerversuchen zeigte auch der Hund wieder, wie ungleich besser als das Kaninchen er mit seinem Verdauungskanal gestellt ist. Während beim Kaninchen schon ein drei Tage langes Hungern genügte, um den verfütterten Keimen die Wege vom Darmlumen ins Körperinnere zu öffnen, muſste beim Hund die Hungerperiode auf 16 Tage ausgedehnt werden, dann erst waren die verfütterten Keime in Organen aufzufinden. Auffallend aber muſs es erscheinen, daſs nach der 12 und 13 Tage währenden Nahrungsentziehung statt der gesuchten verfütterten Keime beim Hund in den Organen Darmkeime beobachtet wurden. Vergleicht man mit diesen Befunden die Ergebnisse der Organuntersuchungen am normalen Hund, wie ich sie an der Hand derselben Methodik früher mitteilte (1., S. 186, 187), so ist der Einfluſs des Hungers unverkennbar.

Faſst man den Widerspruch ins Auge, der darin zu liegen scheint, daſs bei Nahrungsentziehung obligate Darmbakterien eher überzutreten vermögen als selbst in groſsen Mengen verfütterte Keime, so könnte man in dieser Beobachtung einen Beweis dafür erblicken, daſs die Aufnahme nicht im Dünndarm

sondern im Dickdarm erfolge; denn die quantitative Prüfung des Darminhaltes in allen Partien ergab, dafs gegenüber dem Befund von reichlichen verfütterten Keimen im Dünndarm ihre Menge im Dickdarm im Verhältnis zu den hier vorhandenen einheimischen Darmbakterien eine spärliche, im Höchstfalle ca. 10% war. Es ist hier aber auf eine Beobachtung aufmerksam zu machen, die für die weitere Klärung der Frage vielleicht nicht unwichtig erscheint: während bei normalen Kaninchen und Hunden der Dünndarm auch in seinen unteren Partien relativ arm an Darmbakterien zu finden ist, sind hier bei den Hungertieren bei weitem gröfsere Keimmengen, insbesondere auch mehr B. coli vorhanden. Während man sonst die Anwesenheit von Keimen im Dünndarm mit dem Vorhandensein von Nahrungsbestandteilen in Zusammenhang bringt, kommen bei den vorliegenden Versuchen Ingesta nicht in Frage, vielmehr scheint im Hungerzustand ein Ascendieren von Dickdarmbakterien nach dem Dünndarm regelmäfsig einzutreten. Es könnte demnach als Ort des Übertritts auch der Dünndarm in Frage kommen. Da drängt sich aber die Frage auf, warum denn die verfütterten Keime, die sich hier doch auch reichlich fanden, zunächst nicht auch zur Aufnahme kamen. Man könnte sich dann vorstellen, dafs die bakterizide Fähigkeit der Darmsäfte oder der Schleimhautzellen den einheimischen Darmbakterienarten gegenüber bei Nahrungsentziehung deshalb eher versagt, weil diese Mikroorganismen doch durch die ständige Berührung mit diesen Schutzkräften des Intestinaltraktus eine gewisse Widerstandsfähigkeit erworben haben, während den verfütterten Saprophyten gegenüber die Abwehrvorrichtungen zunächst noch ausreichen. — Da nun aufserdem bei diesen letzten Versuchen (Vers. 12, 13) das Verhältnis der verfütterten zu den einheimischen Darmbakterien im Dickdarm nicht ein anderes war wie bei den voraufgehenden, in denen ein Übertritt des verabreichten Roten Kielers nicht nachgewiesen werden konnte, so ist auch hierin nicht ein Beweis dafür zu erblicken, dafs die Aufnahme nun unter allen Umständen im Dickdarm vor sich gegangen sein mufs.

Man könnte auch zur Erklärung der Tatsache, dafs beim Hungerhund in den Organen viel frühzeitiger die Darmbewohner anzutreffen sind als verfütterte Keime, auf die Vermutung kommen, dafs es sich bei dem ersteren Befunde um latente Keime handelt, die bei früherer Gelegenheit übergetreten sind und nun in dem hungernden Organismus an Vitalität gewinnen, so dafs jetzt ihr Nachweis in der Kultur gelingt, der sonst wegen ihres in der Latenz geschwächten Zustandes oder wegen der im Kulturglas vor sich gehenden Organautolyse auf Schwierigkeiten stiefs. Nach meinen früheren Untersuchungen am normalen Hund, bei denen schon eine weitgehende Aufschliefsung der Organe erfolgte, ist mir eine so umfangreiche Latenz, wie sie hier vorgelegen haben müfste, sehr unwahrscheinlich.

Schliefslich möchte ich noch eine Beobachtung mitteilen, die ich an allen Hungerhunden machen konnte. Das ist die starke Schwellung der Mesenterialdrüsen. Es ist mir nicht bekannt, dafs man bei der Sektion von Hungertieren hierauf aufmerksam geworden ist. Da mir aber durch die Untersuchungen an normalen Hunden Gelegenheit zu vergleichenden Beobachtungen gegeben war, so möchte ich diesen Befund hervorheben, der ja mit den sonstigen Resultaten in Zusammenhang zu bringen ist.

Die Versuche an den übrigen Tieren bedürfen keiner Erläuterung. Es ergibt sich aus allen Untersuchungen, dafs bei Kaninchen, Hunden, Katzen, Mäusen und Ratten durch Inanition sowohl für verfütterte saprophytische Keime als auch für im Darm heimische Bakterien Bedingungen für das Eindringen in die Lymph- und Blutbahn sowie in die Organe geschaffen werden.

Es ist unschwer, mit Hilfe dieser Tatsache die Entstehung einer Reihe von infektiösen Krankheitsprozessen zu beleuchten und klarer zu erkennen, als das bisher der Fall war. Da diese Fragen indessen weiterer experimenteller Bearbeitung zugängig sind, so begnüge ich mich vorläufig, hier noch Erörterungen über den Einflufs des Hungers auf die Einverleibung von Mikro-

organismen anzuschliefsen, die das Hauptsächliche des Bekannten berühren und einige eigene weitere Beobachtungen verwerten.

Schon Pasteur brachte experimentell die Nahrungsentziehung in Beziehung zur Infektion: er liefs Hühner nach der Impfung mit Milzbrand 2—8 Tage hungern und stellte fest, dafs die Hühner nicht an Milzbrand erkrankten. Hiermit widerlegte er zugleich die Ansicht Colins, die dahin ging, dafs die von Pasteur durch Abkühlung milzbrandempfänglich gemachten Hühner nicht infolge der Abkühlung, sondern u. a. infolge der Inanition ihre Milzbrandimmunität verloren hätten. In gröfseren Versuchsreihen prüften Canalis und Morpurgo(5) den Einflufs des Hungers auf die Milzbrandinfektion. Sie gingen von den Untersuchungen von Delafond und Bourguignon aus, die die Empfänglichkeit der schlechtgenährten Schafe für Krätze gegenüber der Unempfänglichkeit wohlgenährter Tiere erwiesen hatten. Canalis und Morpurgo wählten als Versuchstiere die gegen Milzbrand relativ resistenten Tauben, Hühner und Ratten. Sie fanden, dafs Tauben konstant der Milzbrandinfektion erliegen, wenn man sie gleichzeitig mit der Inokulation in den Hungerzustand versetzt; Tauben, welche vor der Impfung sechs Tage lang gehungert hatten, widerstanden der Infektion, wenn sie unmittelbar nach der Impfung wieder gefüttert wurden. Dauerte die voraufgehende Hungerperiode länger als sechs Tage, so gingen sie in der Regel trotz der Fütterung zugrunde. — Bei der Mehrzahl der Hühner gelang es, die Infektion hervorzurufen, wenn der Impfung eine Hungerperiode von 3—7 Tagen vorausging. Liefs man die Hühner erst nach der Impfung hungern, so behielten sie ihre Immunität. Weifse Ratten konnten durch Hunger nicht empfänglich für Milzbrand gemacht werden. Canalis und Morpurgo weisen noch nach, dafs bei hungernden Tauben der Verlust der Milzbrandimmunität nicht auf die Temperaturerniedrigung, welche den Hunger begleitet, bezogen werden kann, denn die Infektion blieb aus, wenn bei geimpften nichthungernden Tieren eine analoge Temperaturverminderung hervorgerufen wurde. Die Beweiskraft dieser Versuche von Canalis und Morpurgo zweifelt Baumgarten an, da bei Tauben an und für sich die

Empfänglichkeit für Milzbrand eine sehr ungleiche ist, ein Einwand, den man auch gegen die Versuche von Bakunin und Boccardi(6) machen mufs. Doch läfst sich wohl bei den grofsen Versuchsreihen, wie wir sie bei Canalis und Morpurgo finden, ein Einflufs des Hungers nicht leugnen. Wenn die infektionbegünstigende Rolle des Hungers im übrigen nicht eindeutig zum Ausdruck kam, so liegt das wohl in der Wahl des infizierenden Keims und in der subkutanen Anwendungsweise, bei der ja doch die Verhältnisse ganz anders liegen wie bei der unter natürlichen Bedingungen erfolgenden Tierinfektion. Zudem ist für den Tiermilzbrand es nicht erwiesen, dafs gerade der Hunger ein Hilfsmoment für die Infektion bildet, es gibt sogar Stimmen von Praktikern, die gerade die besternährten Tiere als am meisten disponiert für Milzbrand halten [John Gerrard(7), Oemler(8)]. — Andere systematische Infektionsversuche als die genannten sind am hungernden Organismus nicht ausgeführt, wohl aber hat man gelegentlich Tiere fasten lassen, um bei Verfütterung infektiösen Materials eine raschere und reichlichere Aufnahme zu erreichen, so liefs Harris(9) Mäuse 12—15 Stunden lang fasten, um sie dann mit Milzbrandsporen zu füttern. Der Einflufs des Fastens kam aber — offenbar der kurzen Frist wegen — nicht zum Ausdruck, von 26 Mäusen starb nur eine an Milzbrand. —

Einige Arbeiten befassen sich mit der Frage, ob auch der als sicher angenommene, die Infektion begünstigende Einflufs des Hungers ebenso wie die durch andere Momente verminderte natürliche Immunität etwa in der Abnahme der bakteriziden Fähigkeit des Blutes der Tiere seine Erklärung finde. So hatten schon Bakunin und Boccardi bei hungernden Tauben eine Verminderung der bakteriziden Serumwirkung gegenüber Milzbrandbazillen gefunden. E. S. London(10) beobachtete, dafs unter 13 Tauben, die er gänzlich oder teilweise fasten liefs, nur eine ein Serum lieferte, das noch bakterizides Vermögen gegen Milzbrandbazillen besafs, bei den übrigen war das Vermögen ganz oder teilweise zu Verlust gegangen. Zu anderen Ergebnissen kam Rosatzin(11) bei Kaninchen, er fand, dafs das

Serum dieser Tiere, wenn sie hungerten, nicht an Wirksamkeit gegen Milzbrand- und Typhusbazillen sowie Choleravibrionen einbüfste. Für Typhusbazillen hatten Meltzer und Norris (12) beim Hund dasselbe konstatiert. Diese differenten Beobachtungen erklären sich vielleicht dadurch, dafs man früher auf die bei der Einsaat in Serum eintretende Agglutination oder auf das erfolgte Fadenwachstum keine Rücksicht genommen hat, so dafs das Plattenverfahren dann unsicheren Aufschlufs geben mufste. Wertvoller als diese Reagenzglasversuche dürften die am Kaninchen angestellten Untersuchungen von Ferranini (13) sein, der normale und hungernde Tiere mit B. coli impfte und nachweisen konnte, dafs der verimpfte Keim aus dem Blut des normalen Tieres bald verschwindet, hingegen im Blute der Hungertiere 14 Tage lang persistierte. Was die Bakteriengiftempfindlichkeit fastender Tiere anlangt, so konnten Teissier und Guinard (14) durch Fasten Hunde gegen die Toxine des Diphtherie- und Pneumoniebazillus sogar widerstandsfähiger machen.

Aus der jüngsten Zeit sind schliefslich noch die Versuche P. Th. Müllers (15) zu erwähnen, der hungernde Tauben mit Bact. typhi, Pyocyaneus, B. dysenteriae, Proteus und V. Metschnikoff behandelte, um dann den Agglutinationswert des Serums zu vergleichen mit dem von nicht hungernden und in gleicher Weise immunisatorisch vorbehandelten Tieren derselben Art. Bei den mit B. typhi und Pyocyaneus behandelten Hungertauben traten mehr, bei den gegen Dysenterie, Proteus und V. Metschnikoff immunisierten Hungertauben traten weniger Agglutinine als bei den Kontrolltieren auf. Eine ebenfalls ungleiche Wirkung des Einflusses des Hungers auf den Komplementgehalt des Blutes geht auch aus den Untersuchungen von Bendivegna und Carini (16) hervor, die hämolytische Komplemente bald vermehrt, bald vermindert fanden.

Meine eigenen Versuche sollten zunächst die Frage beantworten, ob im Serum hungernder Tiere eine Ab- oder Zunahme der natürlicherweise gegenüber einer Reihe von Keimarten vorhandenen Agglutinine erfolge; ob ferner ein hungerndes Tier Agglutinine gegen die im Darm einheimischen Bakterien bildet;

ob schliefslich beim Hunger durch Verfütterung solcher Keime, die, wie ich beobachtet hatte, vom Darm aus in Organe eindringen, eine spezifische Agglutininbildung eingeleitet wird.

Versuchsanordnung: Erwachsenen Kaninchen wird vor der Hungerperiode Blut zur Bestimmung des Agglutiningehaltes entnommen. Darnach hungern die Tiere die angegebene Zeit und werden sodann 1 Woche lang gefüttert, nun zweite Blutentnahme, bei Kaninchen 1 und 2 abermaliges Hungern, dann 1 Woche lang Fütterung, zweite Blutentnahme. Beim erst- und zweitmaligen Füttern nach der Hungerperiode wurden dem Futter je eine Platte (Agar, Durchmesser 16 cm, 1 Tag 27°) Roten Kielers beigemengt.

Die Agglutination wurde makroskopisch geprüft.

I. Hungerperiode 3 Tage. II. Hungerperiode 4 Tage.

	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
1. Kaninchen, schwarz.								
a. Roter Kieler								
vor Hungern	—	—	—	—	—	—	—	—
nach I. Hungerperiode .	—	—	—	—	—	—	—	—
nach II. » . .	—	—	—	—	—	—	—	—
b. B. coli vom gleichen Kaninchen isoliert								
vor Hungern	+	+	+	—	—	—	—	—
nach I. Hungerperiode .	+	+	+	+	—	—	—	—
nach II. » . .	+	+	+	+	+	+	—	—
c. Typhus »Dr.«								
vor Hungern	+	+	—	—	—	—	—	—
nach I. Hungerperiode .	+	+	—	—	—	—	—	—
nach II. » . .	+	+	—	—	—	—	—	—
d. Cholera »S«								
vor Hungern	+	+	+	—	—	—	—	—
nach I. Hungerperiode .	+	+	—	—	—	—	—	—
nach II. » . .	+	+	—	—	—	—	—	—
2. Kaninchen, gelb.								
a. Roter Kieler								
vor Hungern	+	—	—	—	—	—	—	—
nach »	+	—	—	—	—	—	—	—
b. Koli desselben Tieres								
vor Hungern	+	+	+	+?	—	—	—	—
nach »	+	+	+?	—	—	—	—	—

	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
c. Typhus »Dr.«								
vor Hungern	+	+	—	—	—	—	—	—
nach »	+	+	—	—	—	—	—	—
d. Friedländ. ähnl. Darmkeim								
vor Hungern	+	—	—	—	—	—	—	—
nach »	+	—	—	—	—	—	—	—
3. Kaninchen, gelb.								
a. Roter Kieler								
vor Hungern	+	—	—	—	—	—	—	—
nach »	+?	—	—	—	—	—	—	—
b. Koli desselben Tieres								
vor Hungern	+	+	+	—	—	—	—	—
nach »	+	+	+	+	+	+	—	—
c. Typhus »Dr.«								
vor Hungern	—	—	—	—	—	—	—	—
nach »	—	—	—	—	—	—	—	—
d. Cholera »S«								
vor Hungern	—	—	—	—	—	—	—	—
nach »	+	—	—	—	—	—	—	—
4. Kaninchen, grau.								
a. Roter Kieler								
vor Hungern	+?	—	—	—	—	—	—	—
nach »	+?	—	—	—	—	—	—	—
b. Koli desselben Tieres								
vor Hungern	+	+	+	—	—	—	—	—
nach »	+	+	+	—	—	—	—	—
5. Kaninchen, grau.								
a. Roter Kieler								
vor Hungern	—	—	—	—	—	—	—	—
nach »	—	—	—	—	—	—	—	—
b. Koli desselben Tieres								
vor Hungern	+	+	+	+	—	—	—	—
nach »	+	+	+	+	+	—	—	—
c. Typhus »Dr.«								
vor Hungern	+	+	—	—	—	—	—	—
nach »	+	+	—	—	—	—	—	—
d. Cholera »S«								
vor Hungern	+	+	+	+	—	—	—	—
nach »	+	+	+	+?	—	—	—	—

Aus diesen Versuchen geht hervor, dafs die Agglutinationswerte des Kaninchenserums gegenüber Typhus und Cholera

durch Hungern weder eine erhebliche Verminderung noch Erhöhung erfahren, sie blieben ungefähr auf gleicher Höhe. Auch gegen den dem hungernden Tiere verabreichten Roten Kieler, der, wie die voraufgehenden Versuche zeigten, bei der gleichen Versuchsanordnung in die Blutbahn und in die Organe übertritt, wurden Agglutinine nicht gebildet. Um so auffallender ist die Beobachtung, dafs bei drei von fünf Kaninchen unter dem Einflusse des Hungers der Agglutinationswert des Serums gegenüber dem aus dem Darm derselben Tiere vor der Hungerperiode isolierten Bact. coli deutlich anstieg. Es liegt die Vermutung nahe, dafs diese Erhöhung des Agglutinationstiters spezifischer Art ist und im Zusammenhange mit den oben wiedergegebenen Beobachtungen über den Übertritt von Darmkeimen während des Hungers steht. Man könnte hier einwenden, dafs ja dann auch gegenüber dem Roten Kieler Agglutinine gebildet sein müfsten. Es steht dahin, ob nicht bei Fortsetzung der Versuche und häufigerer Einführung dieses Keimes mit der Nahrung nicht doch auch eine Agglutininbildung angeregt werden kann. Man wird auch, um diese Differenz zu verstehen, an die verschiedenartige Qualität der geprüften Keimarten denken müssen. So darf man vermuten, dafs B. coli eher dazu befähigt sein dürfte, im Organismus eine Gegenreaktion anzuregen wie der saprophytische Kieler Wasserbazillus. Dafs die Agglutininbildung gegenüber dem B. coli des gleichen Tiers in einigen Fällen so prompt erfolgte, ja in einem Falle sogar ein beträchtliches Emporschnellen zur Beobachtung kam, deutet vielleicht darauf hin, dafs beim Kaninchen öfters Gelegenheit zum Eindringen von Darmkeimen gegeben ist; hierbei kann eine mehr oder weniger starke Bildung von Agglutininen hervorgerufen werden, die sich in der Folgezeit ganz oder teilweise verlieren. So wie man nun aber bei der künstlichen Immunisierung bei Tieren, die man nach Vorbehandlung mit spezifischen Keimen solange in Ruhe läfst, bis die spezifischen Agglutinine aus dem Blute verschwinden, durch eine erneute Verabreichung selbst kleiner, an und für sich zu stärkerer Agglutininanregung nicht befähigter Mengen des Infektionsstoffes einen rapiden Anstieg des Aggluti-

nationswertes erzielen kann (Rufus J. Cole[17]), so ist es auch hier möglich, dafs der Körper, der durch vorherige von Darmkeimen aus erfolgende Invasionen schon Agglutinine gebildet hatte, auf ein abermaliges späteres Eindringen, z. B. während des Hungerns, in intensiver Weise reagiert. Es würde damit auch zu verstehen sein, dafs nicht in jedem Falle beim Hunger dieser Anstieg kenntlich wird, und es würde sich der Widerspruch lösen, dafs gegenüber den verfütterten Keimen zunächst eine Erhöhung des Agglutinationswertes in den vorliegenden Versuchen nicht eintrat. Man kann es mithin nicht in jedem Falle einem Serum ansehen, ob der Rezeptorenapparat des Körpers keine oder sogar eine intensivere Reaktionsfähigkeit besitzt: in dem einen Falle zeigt das Fehlen der spezifischen Stoffe im Serum in der Tat, dafs der Organismus auf eindringende fremde Keime noch nicht eingestellt ist, im anderen Falle aber kann bei einer geringsten Attacke der Rezeptorenapparat in eine Aktion treten, die in keinem Verhältnis zu dem Angriff zu stehen braucht, d. h. ein geringer Anlafs könnte eine sehr starke Gegenreaktion auslösen: in beiden Fällen kann der Serumbefund derselbe, der Ausgang aber ein total verschiedener sein.

Ganz kurz soll schliefslich noch über Versuche berichtet werden, die die Frage nach dem Verhalten der bakteriziden Wirkung des Serums hungernder Tiere zum Gegenstande hatten. Die oben angeführten, bisher bekannt gewordenen Versuche in der gleichen Richtung widersprechen einander. Auch mir ist es bis jetzt nicht gelungen, Gesetzmäfsigkeiten aufzufinden. Die Versuche werden noch fortgesetzt und erweitert, hier soll nur berichtet werden, dafs ich beim bakteriziden Reagensglasversuche, entgegen der naheliegenden Annahme, das bakterizide Vermögen des Blutes müsse im Inanitionszustande unbedingt heruntergehen, in ebensoviel Fällen sogar eine Verstärkung der bakterientötenden Eigenschaften, in einigen Fällen ein Gleichbleiben konstatieren konnte. Eine Verallgemeinerung der am einzelnen Tier erhaltenen Ergebnisse ist auch hier durchaus nicht am Platze, und ebensowenig mufs es richtig erscheinen, sich an die zur Gewohnheit

gewordene Identifizierung von Blutserum- und Körperbeschaffenheit zu binden.

Wenn wir so bei der Untersuchung des Blutes hungernder Tiere keine Anhaltspunkte dafür gewinnen, dafs für den beim Hunger erfolgenden Übertritt von Darmkeimen das ausschlaggebende Moment in dem *Serum*verhalten zu finden sei, so ist es doch ebenso verfrüht, *andere* Veränderungen im Organismus, wie sie bei Nahrungsentziehung sich einstellen, dafür verantwortlich zu machen. Rechnet man aber zunächst mit dem, was wir wissen, so ist es doch wohl das Ungezwungenste, für die weitere Betrachtung von der beim Hunger so offensichtlich eintretenden Minderwertigkeit der Organe, von der Infirmität der Einzelzelle auszugehen. Wir wissen, dafs bei der *Inanition* die Funktion der *Drüsen*, insbesondere der Verdauungsdrüsen, aufs schwerste alteriert wird, und dafs der *Darm* zu denjenigen Organen gehört, die die relativ stärkste Gewichtsabnahme aufweisen; dafs ferner die *Peristaltik* darniederliegt und dafs, wie der Hungerkot zeigt, das *Schleimhautepithel* einer starken Abschilferung anheimfällt. Obwohl unsere Kenntnisse über die Verteidigungskräfte des normalen Magendarmkanals gegenüber Mikroorganismen noch sehr der Vertiefung bedürfen, so darf man wohl heute schon annehmen, dafs gerade die Integrität der Schleimhautdecke, die normale Quantität und Qualität der Verdauungsdrüsensäfte und die geordnete Funktion der Peristaltik wichtige Glieder in dem komplizierten Mechanismus der Schutzapparate des Intestinaltraktus sein dürften.

Die vorliegenden, sowie die in Bd. 52, S. 179 und Bd. 53, S. 50 dieser Zeitschrift mitgeteilten Tierversuche sind mit Unterstützung der Gräfin Bose-Stiftung ausgeführt. Dem Kuratorium der Stiftung bin ich zu ergebenem Danke verpflichtet.

Literatur.

1. Ficker, M., Diese Zeitschrift, Bd. 52, S. 179.
2. Conradi, H., Hofmeisters Beiträge, I. Bd., S. 193.
3. Schlesinger, E., ebenda, IV. Bd., S. 87.
4. Colin, Recueil de méd. vét., T. 5, Serie 6, S. 744.
5. Canalis, P. u. B. Morpurgo, Fortschr. der Medizin, Bd. 8, S. 693.
6. Bakunin u. Boccardi, Rif. med., 1891, S. 445.
7. John Gerrard, Veter. splen. discase, 1875, S. 32.
8. Oemler, Berl. Arch., 1876, S. 257.
9. Harris, 19. Annual Report etc. Ref. Baumgarten, 1890, S. 544.
10. London, E. S., Compt. rend. (Acad.), T. 122, S. 1278.
11. Rosatzin, Th. in Lubarsch, Zur Lehre von den Geschwülsten, S. 77.
12. Meltzer u. Morris, Journ. of exper. med., Vol. 4, S. 131.
13. Ferranini, Ref. Baumgarten, 1896, S. 733.
14. Teissier u. Guinard, Arch. de Méd. expér., t. 9, S. 994.
15. Müller, P. Th., Diese Zeitschrift, Bd. 51, S. 365.
16. Bendivegna u. Carini, Lo Sperimentale, Vol. 54, Fasc. 5, S. 490.
17. Rufus, J. Cole, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 46, H. 3.

Über das Verhalten der aeroben Keime gegenüber der absoluten Sauerstoffentziehung.

Von

Dr. **Walther Willimsky**.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin. Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Rubner.)

Während die Frage der Sauerstoffbedürftigkeit der sogenannten Anaerobier zum extensiven Leben heute noch der definitiven Beantwortung harrt, ist es bei den aeroben Keimen keinem Zweifel unterworfen, dafs sie den Sauerstoff zur aktiven Lebensführung nötig haben. In der Oxydation der Nahrungsstoffe finden sie ihre Lebensenergie. Fehlt der Sauerstoff, so tritt Stillstand der Funktionen ein. Hesse(1) hat durch gasanalytische Versuche gefunden, dafs bei absoluter Sauerstoffentziehung eine Entwicklung der aeroben Keime auch nicht in Spuren nachweisbar ist. Die Gröfse des Wachstums läuft proportional mit der Gröfse der Sauerstoffaufnahme und der Kohlensäureausscheidung. Eine andere Frage ist es, ob die schädigende Einwirkung der Sauerstoffentziehung besonders bei längerer Dauer so eingreifend ist, dafs das Leben völlig erlischt, oder ob die Keime ein latentes, bei günstigen Bedingungen zu aktivem Leben wieder erweckbares Dasein zu fristen vermögen. Da Untersuchungen dieser interessanten Frage — systematischer Natur wenigstens — nicht zu bestehen scheinen, so habe ich eine Klärung dieser Verhältnisse herbeizuführen versucht.

Zu meinen Untersuchungen verwandte ich aerobe Keime, die keine Sporen bilden, und zwar die Institutsreinkulturen: Cholera »Saratow«, Alcaligenes II und Fluorescens non liquefaciens. Bei der Versuchsanordnung ging ich aus von 20stündigen Agarstrichkulturen, die im Brutschrank bei optimaler Temperatur gewachsen waren, also Cholera und Alcaligenes bei 37°, Fluorescens non liquefaciens bei 27°. Angelegt waren die Kulturen so, daſs vorher aufgekochter Agar, immer in gleicher Menge und von derselben Herkunft, auf Petrischalen gleichen Durchmessers gegossen, und dann auf der festgewordenen Fläche mit derselben sterilen Platinnadel die gleiche Menge Material einer ebenfalls 20 Stunden bei optimaler Temperatur gewachsenen Kultur in parallelen Strichen aufgetragen wurde.

Zur Erzielung der Anaerobiose wurde die Methode der Verdrängung der atmosphärischen Luft durch Wasserstoff gewählt, unter Benutzung des von Bischoff(2) zur Anaerobenzüchtung angegebenen Apparates, eines mit Ab- und Zufluſsvorrichtung versehenen und luftdicht abschlieſsbaren Glaszylinders, der in zweckmäſsiger Weise den exakten Gastausch gestattet. Der Wasserstoff wurde nicht entwickelt, sondern einer fabrikmäſsig hergestellten Wasserstoffbombe mit 1500 l Inhalt entnommen. Er erwies sich bei der Prüfung als chemisch rein. Die Handhabung der Technik war folgende: Nachdem in dem im Bischoffschen Apparat befindlichen Plattengestell die Kulturplatten so untergebracht waren, daſs die Impffläche nach unten sah, wurde das unter starkem Druck ausflieſsende Wasserstoffgas 15—20 Minuten durch den Apparat geleitet. Um die womöglich noch zurückgebliebenen Spuren von Sauerstoff zu tilgen, wurde in die am Boden des Zylinders befindliche Glasschale mit Pyrogallussäure 10proz. Kalilauge aspiriert, nachdem vorher mittels der Wasserstrahlpumpe ein Vakuum erzeugt worden war. Alle diese Handhabungen wurden mit äuſserster Vorsicht ausgeführt und zum Schluſs der Apparat überall da, wo er nicht in toto zusammenhing, mit Paraffin überzogen. Auf diese Weise wurde eine sauerstofffreie Atmosphäre gewährleistet und dadurch demonstriert, daſs auch nach mehreren Wochen die Pyrogallussäure

nicht den bekannten braunschwarzen Ton annahm, sondern eine helle, leicht gelbliche Farbe behielt.

Wenn in der eben erschienenen Arbeit von Cl. Fermi und Bassu(3), die sich mit der Kritik der Technik der Anaerobiose beschäftigt, die Unzulänglichkeit der Methode der Luftverdrängung durch Wasserstoff aus der sofortigen Bräunung der Pyrogallussäure gefolgert werden konnte, so liegt das meiner Überzeugung nach daran, dafs das Durchleiten des unter gar keinem oder nur sehr geringem Druck stehenden, auf gewöhnliche Art entwickelten Gases nicht den Effekt hat wie der energische Strahl des komprimierten Gases der Bombe, der die Luft vor sich hinwegfegt und den Raum sozusagen auswäscht.

Auf die Frage der Sauerstoffreinheit des Nährbodens wird noch zurückgekommen werden.

Um Fehlerquellen auszuschalten, wurde das Fernhalten sekundärer schädigender Momente nicht aufser acht gelassen. Die Wirkung des Lichtes, dem im sauerstofffreien Raum eine erhöhte bakterizide Wirkung zukommt, wurde ausgeschaltet, indem die Zylinder in einem dunklen Raum untergebracht wurden. Der Austrocknung des Nährbodens war nach Möglichkeit vorgebeugt, da der Apparat in seiner Anordnung an und für sich eine feuchte Kammer darstellte. Was die Temperatur betrifft, so wurden die Apparate bei Zimmertemperatur belassen, da nach den Untersuchungen von Gotschlich und Weigang(4) bei längerem als 20stündigem Verweilen im Brutschrank ein rapides Zugrundegehen der Keime stattfindet, so dafs z. B. die bei 37° gehaltene Cholerakultur nach zwei Tagen nur noch 10%, nach drei Tagen nur noch 1% der Individuen am Leben hat, während eine rechtzeitige Übertragung aus dem Brutschrank in eine niedere Temperatur ein längeres Verweilen der Individuenzahl auf der ursprünglichen Höhe zur Folge hat.

Zum Vergleich ging parallel mit dieser anaeroben Anordnung eine aerobe, indem diesmal die Zylinder die Luftatmosphäre behielten, im übrigen aber die Kulturen unter denselben Bedingungen gehalten wurden.

Nachdem die Kulturplatten verschieden lange Zeit unter Anaerobiose gehalten worden waren, wurde die Methode der quantitativen Keimbestimmung angewandt, um zu ermitteln, ob und wieviel Individuen beim Überführen in günstige Lebensbedingungen wieder zum Keimen gebracht werden können.

Von dem Kulturbelag wurde eine Pfeiffersche Normalöse (1 mg), — die, wie wir uns überzeugten, auch in unseren Händen ein brauchbares Mafs abgab — ohne strikte Unterscheidung von Randpartien und Zentrum des Kulturrasens abgehoben. Die nötige Verdünnung wurde erzielt durch Aufschwemmung dieser Einheitsmenge in indifferenter Aufschwemmungsflüssigkeit (Ficker(5) — Erlenmeierkölbchen mit 50 ccm — und weitere Verteilung von 0,2 ccm dieser ersten Aufschwemmung in einem zweiten Kölbchen mit 50 ccm derselben Flüssigkeit. Mit der mit 0,2 ccm dieser zweiten Aufschwemmung innig vermischten Nährgelatine von immer der gleichen Menge (8 ccm) wurden dann Platten gegossen und nach zweitägigem Aufbewahren bei optimaler Temperatur die Kolonienzählung mit dem Zählmikroskop vorgenommen.

Die Berechnung ergab die folgenden Zahlenwerte.

I. Cholera „Saratow“.

Keimzahl der in 20 Stunden bei 37° gewachsenen Kultur im Durchschnitt: 1 Normalöse = 720 000 000.

Keimzahl der bei Zimmertemperatur gehaltenen Kultur		
in Luft	nach Tagen	in Wasserstoffatmosphäre
796 109 000	1	470 800 000
723 759 000	2	374 750 000
689 375 000	3	359 429 000
458 326 000	4	169 801 000
372 532 000	5	137 625 000
256 938 000	6	93 587 000
160 240 000	7	72 360 000
21 209 100	23	12 550 000

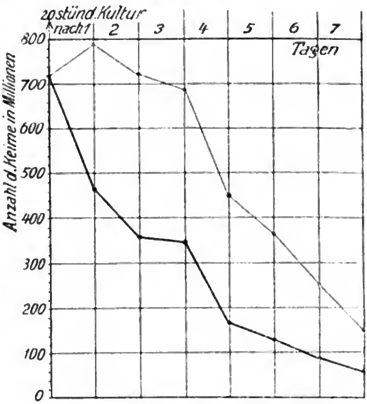
II. Alkaligenes II.
Keimzahl der in 20 Stunden bei 37° gewachsenen Kultur:
1 Normalöse = 475 000 000.

Keimzahl der bei Zimmertemperatur gehaltenen Kultur		
in Luft	nach Tagen	in Wasserstoff-atmosphäre
482 487 000	1	310 062 000
471 754 000	3	271 143 000
313 529 000	4	227 598 000
226 841 000	5	184 485 000
110 493 000	6	105 271 000

III. Fluorescens non liquefaciens.
Keimzahl der in 20 Stunden bei 27° gewachsenen Kultur:
1 Normalöse = 1 175 000 000.

Keimzahl der bei Zimmertemperatur gehaltenen Kultur		
in Luft	nach Tagen	in Wasserstoff-atmosphäre
1 649 867 000	1	696 340 000
1 262 216 000	2	408 745 000
1 155 000 000	3	376 500 000
751 000 000	5	321 580 000
493 587 000	6	235 875 000

I. Cholera „Saratow".



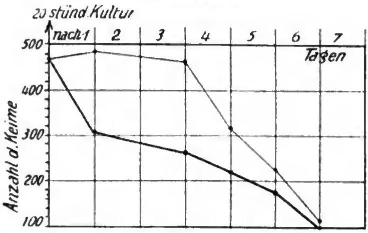
——— Kurven der aeroben Reihen.
——— Kurven der anaeroben Reihen.

Am auffallendsten ist zunächst an diesen Resultaten der Unterschied in der Keimzahl der anaerobiotisch und der aerobiotisch gehaltenen Reihe, der am markantesten gleich am 1. Tage einsetzt. Dafs dieser Unterschied nicht blofs in dem Wachstumsstillstand der anaerob gehaltenen Kulturen einerseits und einer weiteren Vermehrung der aerob gehaltenen anderseits besteht, zeigt die Keimzahl der 20-stündigen Kultur, von der jedesmal ausgegangen wurde, und die sich in denselben engen Grenzen hielt. Wie schon Gotschlich und Weigang zeigten, ist nämlich das Maximum der Entwicklung der bei Bruttemperatur gehaltenen Kulturen schon

in den ersten 12 bis 20 Stunden erreicht, und dann tritt der Abfall ein, oder es erfolgt beim Versetzen in niedere Temperatur höchstens noch ein kurzer Anstieg, der, wie in unseren Versuchen, einen Zuwachs, am 1. Tage von 9,5% an Keimen bei Cholera, 1,75% bei Alcaligenes und 40% bei Fluorescens non liquefaciens in der Einheit darstellt.

Wenn wir bei der anaeroben Anordnung die Vermehrung als durch Wachstumsstillstand aufgehoben betrachten — was, wie wir noch sehen werden, nicht ganz den Tatsachen entspricht — und beim zahlenmäfsigen Vergleich von der Individuenmenge

II. Alkaligenes II.

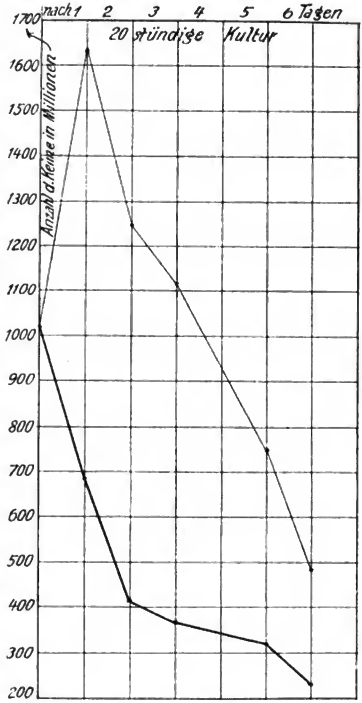


der 20stündigen Kultur ausgehen, so zeigt sich, dafs schon nach eintägiger Einwirkung bei Cholera 35%, bei Alcaligenes 35% und bei Fluorescens non liquefaciens 43% nicht mehr zum Auskeimen gelangen. Dafs dieser Ausfall auf dem Absterben der Keime und nicht blofs auf einem weiteren Verharren in einem latenten Zustand beruht, erhellt daraus, dafs die optimalen Lebensbedingungen — freier Zutritt von Sauerstoff, günstiger Nährboden, Bruttemperatur — selbst nach mehrtägiger Einwirkung keinen anderen Erfolg hatten, eine weitere fortgesetzte Beobachtung der Aussaatplatten keinen Zuwachs etwa sich erholender Kolonien konstatieren konnte, und dafs schliefslich eine fortgesetzte Zählung der nach der Anaerobiose an die Luft gebrachten Ausstrichplatten eine Zunahme der Keime nicht ergab.

Der andere ausgekeimte Teil hatte die Schädigung vertragen, und es lag die Frage nahe, ob denn auch alle Keime der Kul-

turen unter denselben anaeroben Bedingungen gestanden hatten. Wie das schon von vornherein zu verneinen war, so ergab auch eine andere Versuchsanordnung, dafs dies nicht der Fall war.

III. Fluorescens non liquefaciens.



Bei der aufserordentlichen Schwierigkeit der technischen Aufgabe, absolut anaerobe Verhältnisse im strengsten Sinne zu schaffen, war von vornherein damit zu rechnen, dafs, wenn schon die Atmosphäre sauerstofffrei genannt werden konnte, doch Spuren am Glase und vor allem im Nährboden trotz der Erhitzung desselben zurückbleiben würden. Und daraus war weiter zu schliefsen, dafs bei der beschriebenen Anordnung die Keime des Kulturrasens, die dem Nährboden am nächsten sind, ihm die Spuren von Sauerstoff begierig entziehen und so ihr Leben fristen, anfangs sogar eines geringen Wachstums fähig sein könnten. Dafs das tatsächlich der Fall war, hatte eine zweite Versuchsanordnung gezeigt. Hier wurden nicht, wie oben, die zu massigen Belägen herangewachsenen Strichkulturen dem Versuch unter-

worfen, sondern es wurden auf einer Agarplatte 2 Tropfen einer Aufschwemmung der 3 Keimarten in indifferenter Flüssigkeit mit dem Glasspatel verrieben, und die so präparierten Petrischalen unter dieselbe anaerobiotische Anordnung wie oben gebracht, nur dafs die Zylinder gleich in den Brutschrank kamen. Hierbei zeigte sich nun schon nach einem Tage, dafs die Keime keine Abnahme zeigten, sondern zu Kolonien herangewachsen waren, die allerdings im Verhältnis zu den auf den aerob gehaltenen Kontrollplatten verschwindend klein waren und sich nicht weiter vergröfserten. Damit stimmt auch die Beobachtung Hesses überein, wonach Choleraeiweifskulturen, die in Wasserstoffatmosphäre gehalten wurden, nur in den ersten Tagen abnehmende Mengen von Kohlensäure produzierten, was sich nur damit erklären läfst, dafs der Nährboden Spuren von Sauerstoff enthielt, die eine Respiration und Vegetation gestatteten. Daraus ergeben sich die Schlüsse:

Während in diesem Falle jeder Keim sozusagen seinen eigenen Acker hatte, der ihm in den Zeiten der Not auch den Sauerstoff lieferte und ihn der einsetzenden Schädigung nicht ganz hilflos aussetzte, konnten bei der anderen Versuchsanordnung, wo die Keime in grofsen dicken Massen zusammengelagert waren, nur die zum Nährboden günstig postierten diesen Ortsvorteil geniefsen, die anderen aber wurden, des Sauerstoffs der Luft und des Bodens beraubt, tatsächlich unter absolut anaerobiotische Verhältnisse gesetzt und mufsten, von der plötzlichen Sauerstoffentziehung überrascht, ersticken.

Vergleichen wir den Erfolg dieser eintägigen Einwirkung der Anaerobiose mit dem einer zunehmenden mehrtägigen und denken uns zur besseren Anschaulichkeit die Zahlenwerte graphisch dargestellt, so kommen wir unter Berücksichtigung des Verhaltens der aerobiotisch gehaltenen Reihe noch zu folgenden weiteren Schlüssen:

Die Kurve der aerobiotisch gehaltenen Keime ist bei allen 3 Keimarten dadurch ausgezeichnet, dafs nach dem kurzen Anstieg am ersten Tage ein kontinuierlicher Abfall folgt, und dafs dieser Abstieg am 4. Tage am steilsten ist. Diese Erscheinung

des Absterbens mit den bekannten ursächlichen Faktoren wird naturgemäfs auch bei der Beurteilung der Resultate der anaerobiotisch gehaltenen Reihe Berücksichtigung finden müssen. Die Zahlenkurve der anaerob belassenen Keime charakterisiert sich durch einen steilen Abfall am ersten Tage, der aber an den folgenden Tagen nicht in gleicher Weise anhält, sondern in einen sanfter absteigenden Bogen übergeht. Mit der aeroben Reihe verglichen, sind die täglichen Differenzen der anaeroben Zahlenwerte noch geringer, so dafs die beiden in demselben Felde eingetragenen Kurven einander immer näher kommen, mit anderen Worten: der Effekt der Sauerstoffentziehung ist in den ersten Stunden der Einwirkung weitaus am gröfsten; alle ungünstig gelagerten und weniger widerstandsfähigen Keime gehen bald zugrunde, die anderen günstiger postierten vermögen ihr Leben auf die Spuren des Sauerstoffs im Nährboden einzustellen und unter steter Auslese der passendsten dahin geführt zu werden, mit immer geringeren Mengen von Sauerstoff auszukommen, so dafs auf diese Weise wenigstens ein latentes Leben möglich ist. Die im Verhältnis zur aeroben Reihe geringeren Differenzen in der Abnahme der Keime sind damit zu erklären, dafs die überlebenden Keime auf demselben Raume infolge ihrer geringeren Anzahl nicht mit soviel Konkurrenten zu kämpfen haben und jene Faktoren der Nährbodenerschöpfung und Stoffwechselgiftbildung infolgedessen in schwächerem Mafse einwirken.

Die Frage der allmählichen Anpassung, die hiermit berührt wurde, wurde noch durch weitere Versuche zu beantworten gesucht. Ausgegangen wurde diesmal von einer schon 8 Tage anaerobiotisch gehaltenen Fluorescens non liquefaciens-Kultur. In bekannter Weise folgte dem Ausstrich dieser Kultur auf eine neue Agarplatte ein 20stündiger Aufenthalt bei 27° im Brutschrank und dann die Anaerobiose bei Zimmertemperatur.

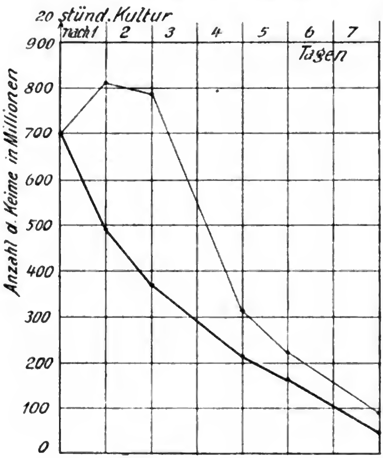
Fluorescens non liquefaciens.

II. Generation (I. Generation 8 Tage in Wasserstoffatmosphäre gehalten).
20stündige bei 27° gewachsene Kultur: 700 000 000 Keime (1 Normalöse).

Keimzahl in Luft	nach Tagen	Keimzahl in Wasserstoffatmosphäre
809 119 000	1	499 360 000
792 533 000	2	384 407 000
304 337 000	4	219 060 000
226 402 000	5	173 041 000
91 928 000	7	56 663 000

Vergleichen wir die Zahlenwerte dieser zwei Generationen hindurch anaerobiotisch gehaltenen Kultur mit jener nur eine Generation unter Anaerobiose gestandenen, so ergibt sich, dafs die Zahlenkurven an und für sich im Prinzip gleich verlaufen. Eine Verschiedenheit besteht aber darin, dafs in der zweiten Generation eine durchgehende beträchtliche annähernd proportionale Verminderung der Keimzahl in der Einheit zu konstatieren ist, die, wie die Zahl der 20stündigen Kultur zeigt, 33% ausmacht. Die Wachstumsintensität der Keime hat also durch die 8tägige Anaerobiose um $^1/_3$ gelitten. Ein weiterer Unterschied besteht in dem Verhältnis der aeroben und anaeroben Reihe. Zwar ist auch hier der Untergang der Keime am ersten Tage am bedeutendsten, doch ist das Prozentverhältnis der lebengebliebenen Keime ein anderes. Während dort nach eintägiger Anaerobiose nur 57% der Keime am Leben blieben, sind es bei der 2. Generation schon 70%. Es scheint also, dafs durch die achttägige Anaerobiose eine Auslese der geeignetsten Keime stattgefunden hat, die, auf eine erneute Anaerobiose besser gerüstet und angepafst, der einsetzenden Schädigung nicht mehr so schnell erliegen. Man wird allerdings auch beachten müssen, dafs bei der, wie oben hervorgehoben, eingetretenen Verminderung der Keimzahl in der Einheit die Keime im ganzen besser

Fluorescens non liquefaciens.



gestellt sind, und dieser Umstand zur Verbesserung des Sterblichkeitsverhältnisses beigetragen haben kann.

Weiterhin wurde in einem zweiten Versuch die Anaerobiose durch 10 Generationen fortgesetzt. Ausgegangen wurde von einer 23 Tage anaerobiotisch gehaltenen Choleraagarstrichkultur. Von dieser wurden Keime in gleicher Menge auf neue Agarplatten übertragen und der anaerobiotischen Anordnung mehrere Tage unterworfen. Die zu kümmerlichen Kolonien ausgewachsenen Keime der zweiten Generation wurden erneut auf Agarplatten ausgestrichen und sofort wieder anaerobiotisch gehalten, und dies so 10 Generationen hindurch fortgesetzt, wobei jede 3—7 Tage unter anaerobiotischen Bedingungen stand. Eine merkbare Anpassung, die sich durch schnelleres Wachstum oder Zunahme in der Gröfse der Kolonien gezeigt hätte, konnte aber nicht nachgewiesen werden.

Die Hauptergebnisse der Arbeit lassen sich kurz, wie folgt, formulieren:

Die aeroben Keime vermögen ihr Leben auf minimale Spuren von Sauerstoff einzustellen und zwar um so besser, je langsamer die Sauerstoffentziehung erfolgt; bei absoluter Anaerobiose aber sterben sie ab, und zwar um so schneller, je plötzlicher diese herbeigeführt wird.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Geh. Med.-Rat Professor Dr. Rubner für die Anregung zu dieser Arbeit, Herrn Professor Dr. Ficker für seine stets freundliche Unterstützung meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

Literatur.

1. Hesse, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. XV, S. 17.
2. Bischoff, Veröffentl. a. d. Gebiet d. Militär-Sanit.-Wesens, Heft 23.
3. Cl. Fermi u. Bassu, Centralbl. f. Bakteriol., Origin.-Mitt., I, Bd. XXXV.
4. Gotschlich u. Weigang, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. XX, S. 376.
5. Ficker, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. XXIX.

Zum Nachweis fäkaler Verunreinigung von Trinkwasser.

Von

Oberarzt Dr. **Christian.**

(Aus dem hygienischen Institut der Universität Berlin. Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Rubner.)

Unter Brauchbarkeit eines Trinkwassers versteht man eine Summe von Eigenschaften, die schon seit längerer Zeit feststeht und als Richtschnur für Begutachtungen dienen soll. Die Anforderungen, welche zu stellen sind, unterliegen je nach den Bedürfnissen der Konsumenten des Wassers in gewissem Grade Schwankungen, welche im Einzelfalle sorgsam zu erwägen sind. Für viele Bestandteile lassen sich unabänderliche Grenzwerte gar nicht angeben, weil einzelne Vorkommnisse z. B. der Chloride, des Ammoniaks, mit Rücksicht auf die Herkunft und Entstehung des Wassers eine wechselnde gesundheitliche Bedeutung haben.

Je eingehender ein Wasser in seinen Eigenschaften studiert wird, je mehr Merkmale desselben genau untersucht werden, um so zuverlässiger wird auch die kritische Beurteilung werden.

Wenn von einigen Autoren die Beurteilung von Trinkwasser und speziell der Brunnenwässer soweit eingeschränkt wird, dafs man nur auf die örtliche Inaugenscheinnahme Wert legen soll, so ist dieser Standpunkt in vielen Fällen geradezu ein Verzicht auf jede wissenschaftlich exakte Beurteilung eines Wassers, und mit Recht haben sich weite Kreise von Sachverständigen gegen eine derartige oberflächliche Betrachtungsweise der vorstehenden bedeutungsvollen Fragen ausgesprochen.

Chemische, physikalische und biologische Methoden liefern uns wichtige Unterlagen für die Beurteilung des Trinkwassers,

nur das fehlerhafte Bestreben, schematisch an der Hand von wenigen Charakteren alle Trinkwässer beurteilen zu wollen, hat zu ergebnislosen Prüfungsreihen geführt.

Die Beurteilung des Wassers ist eine schwierige Aufgabe, und wer die Mittel zur fachmännischen Beurteilung nicht besitzt, sollte auf gutachtliche Äufserungen verzichten; diejenigen Kreise, welche sich berufen fühlen, in Sachen der Trinkwässer mit zu beraten, können nicht verlangen, dafs die Trinkwasserprüfung mit Rücksicht auf mangelnde Vorkenntnisse tunlichst vereinfacht werde, sondern haben ihre Ausbildung entsprechend den zu lösenden Aufgaben zu vervollkommnen.

Es erscheint auch viel wichtiger, wenige Wässer genau als zahllose Wasserproben nach unzureichender Methodik zu untersuchen.

Die weitere Ausbildung der Untersuchungsmethodik ist dringend zu wünschen und jeder Fortschritt in der Möglichkeit, weitere Merkmale des Trinkwassers mit Sicherheit zu bestimmen, mit Genugtuung zu begrüfsen.

Die bakteriologische Untersuchung hat sich zumeist nur auf Keimzählung erstreckt, eine Methode, die wohl für bekannte, unter dauernder Kontrolle stehende Wässer einen feinen Indikator für Verunreinigung darstellt, für erstmalige Untersuchungen aber völlig unzureichend ist.

Hier liegt das Bedürfnis nach einer Methode vor, die Schädlichkeit bzw. Gefährlichkeit eines Wassers oder dessen Unschädlichkeit deutlich zu erweisen. In diesem Sinne sind schon eine ganze Anzahl von Versuchen gemacht worden, die in verschiedene Richtungen gegangen sind. Ich will nur einen Weg verfolgen, der mir der aussichtsreichste zu sein scheint.

Fragen wir uns, woher die Gefahren stammen, die im Trinkwasser die Gesundheit des Menschen bedrohen, so kommen fast ausschliefslich die menschlichen Ausscheidungen, und hierbei in erster Linie der Kot, in Betracht. Bei Cholera und Dysenterie scheinen die Fäces die einzige Infektionsquelle zu bilden, beim Typhus kommt noch der Urin hinzu, aber erst in zweiter Reihe. Hinter diesen beiden treten die übrigen Abfallstoffe, was die

Trinkwasserinfektion anlangen könnte, ganz zurück. Abgesehen davon werden wohl in der Mehrzahl der Fälle sämtliche menschliche Ausscheidungen auf demselben Weg in das Wasser gelangen können, oder wenigstens wo das eine möglich ist, kann das andere nicht ausgeschlossen werden. Es ist also gerechtfertigt, wenn man nur aus dem Vorhandensein einer Verunreinigung durch Fäces auf die bedrohliche Nähe einer Infektionsquelle schliefst. Zum Nachweis einer solchen fäkalen Verunreinigung liegt es nahe, den im Kot so reichlich vorhandenen Kolibazillus als Indikator zu wählen. Und das ist seit langem des öfteren geschehen. Wie richtig man diese Überlegung angestellt hatte, zeigt beispielsweise eine Filterprüfung, die Clark und M'Gage(1) in der amerikanischen Stadt Lawrence ausgeführt haben. Nach einer Reparatur des Filters war dasselbe undicht geworden. Im filtrierten Wasser konnten Kolibakterien nachgewiesen werden. Zugleich trat in der Stadt eine Typhusepidemie auf, die nach 3 Monaten wieder erlosch, zur selben Zeit, als im filtrierten Wasser in je 1 ccm Bacterium coli nicht mehr gefunden werden konnte. Hier steht es aufser Frage, dafs der Kolibazillus die fäkale Verunreinigung und somit die Infektion des Wassers anzeigte. Kann man nun diese Schlufsfolgerungen, deren Berechtigung in dem besonderen Falle aufser Zweifel steht, verallgemeinern?

Zur Entscheidung dieser Frage mufs man auf den Begriff »Bacterium coli« näher eingehen. Wir verstehen unter diesem Namen ein Stäbchen, das gewisse Eigenschaften besitzt und im Darm vorkommt. Es gibt aber auch aufserhalb des Darms Bakterien, die sämtliche allgemein bekannten Eigenschaften des Darmbewohners besitzen, ohne jemals selbst durch ihre Herkunft oder vermöge ihrer Abstammung zu den Darmbewohnern zu zählen. Nehmen wir nur einige dieser Eigenschaften zum Kriterium, so fällt der Begriff »Bacterium coli« so weit aus, dafs wir eine ganze Gattung darunter rechnen müssen. Aus diesem Grunde hält Kruse(2) das Bacterium coli für ganz ungeeignet zum Nachweis fäkaler Verunreinigung. Wenn er zum Nachweis die morphologischen Verhältnisse, das Wachstum auf den gewöhnlichen

Nährböden, das Verhalten zu zuckerhaltigen Substraten und zu Milch in Betracht zog, so glaubte er sie fast überall finden zu können, »oft genug in Wässern, die nicht einmal anderen Verunreinigungen, geschweige denn denen durch Fäkalien ausgesetzt seien«. Weifsenfeld(3) hat hierfür einen experimentellen Beitrag geliefert, indem er eine gröfsere Anzahl von Brunnenwässern untersuchte. Er fand in jedem Falle Kolibazillen, freilich bei den guten Wässern erst, wenn er 1 l dem Anreicherungsverfahren unterzog. In gleicher Weise fand v. Freudenreich(4) in den meisten Wässern Kolibazillen, wenn er nur eine genügend grofse Menge zur Untersuchung nahm; nur die »sehr guten« Wässer waren frei von ihnen.

Diesen Befunden, die für die Ubiquität der Kolibakterien zu sprechen scheinen, wird durch andere Beobachtungen widersprochen, und das hat seinen Grund in der Verschiedenheit der Nachweismethoden. Je strenger man die Anforderungen zur Identitätsbestimmung stellte, desto seltener wurden die ubiquitären Kolibazillen. Weifsenfeld betrachtete alle diejenigen Mikroorganismen als Kolibakterien, die mittelgrofse Bazillen darstellten, auf Gelatine weinblattähnliche Kolonien und im Zuckeragarstich Gas bildeten, mehr oder weniger beweglich oder unbeweglich waren und sich nicht nach Gram färbten. Er versuchte zunächst ihr Wachstum bei 37° in Bouillon oder Peptonkochsalzlösung mit Pariettischem Zusatz (Phenol und Salzsäure) zu erhalten; kam er damit nicht zum Ziel, so liefs er den (Pariettischen) Zusatz weg.

v. Freudenreich benutzte die Pariettische oder die Vincentsche Methode (Peptonwasser, 0,07% Phenol, Bebrütung bei 42°) oder auch die Milchzuckervergärungsprobe bei 35° und fand so das Fehlen der Kolibakterien in den sehr guten Wässern.

Schardinger(5), der das Wasser mit Traubenzuckerbouillon vermischte, bei 37° bebrütete und dann den Kolinachweis durch Prüfung auf fäkulenten Geruch, auf Indol und Schwefelwasserstoff führte, fand die in Frage stehenden Bakterien nicht so ungemein verbreitet, in vielen hundert Wasseruntersuchungen nur 5 Mal und niemals als zufällige Luftverunreinigung auf

Platten. Abbe(6) benutzt eine Milchzuckerpeptonkochsalzlösung zu seinen Versuchen, Houston(7) anderseits legt Schüttelkulturen in Zuckergelatine an und hält sie bei 20°, in der Absicht, sämtlichen vergärenden Keimen, auch denen, die höhere Temperaturen nicht vertragen, das Wachstum zu gestatten.

Petruschky und Pusch(8) wieder legen Wert darauf, die Kolibakterien bei 37° in Bouillon anzureichern und glauben auf diese Weise die Wasserkeime auszuschliefsen, die bei niederen Temperaturen sich immer vorgedrängt und die Täuschung einer Fäkalverunreinigung hervorgerufen hatten. Sie fügen den kennzeichnenden Merkmalen noch die Säurebildung (Rötung der Lackmusmolke) hinzu. Alle die zuletzt erwähnten Untersucher finden in reinen Wässern keine Kolibakterien und stellen diesen Mikroorganismen ein gutes Zeugnis für ihre Brauchbarkeit als Indikatoren fäkaler Verunreinigung aus.

Es ist leicht zu sehen, dafs man in der Erkenntnis des wahren Zusammenhanges weiter gekommen ist, je mehr man den Begriff »Bakterium coli« einschränkte. Auf die Methoden hierzu im einzelnen kritisch einzugehen, ist nicht nötig; zweifellos beruhen sie auf sorgfältigem Studium der Lebensvorgänge des Mikroben und bestehen zu recht. Nur möchte ich das Phänomen der Indolbildung und die Fähigkeit der Tierpathogenität, das beispielsweise von Levy und Bruns(9) vorgeschlagen ist, nicht für eben wertvoll anschlagen, da es echte Kolistämme gibt, die diese beiden Forderungen nicht erfüllen.

Was nun aus der Erörterung der ganzen Frage hervorgeht, ist die Tatsache, dafs der Nachweis des Bact. coli ein sehr komplizierter ist, wenn man sicher sein will, das echte Bact. coli vor sich zu haben. Alle erwähnten Methoden zusammen sind aber noch nicht einmal einwandsfrei, weil der Beweis fehlt, dafs die mit ihrer Hilfe identifizierten Bakterien nur aus dem menschlichen Darm stammen können, vielmehr wird später gezeigt werden, dafs dies sehr zweifelhaft ist. Dieser Beweis könnte erbracht werden, wenn man ein spezifisches Serum anzuwenden in der Lage wäre, wie dies auch schon gefordert worden ist. Allein hier läfst uns die Technik im Stich, da es ja schon sehr

schwer ist, ein polyvalentes Koli-Serum zu erlangen, wird uns ein omnivalentes kaum jemals gelingen. Auch ist ein solches Verfahren für die Praxis viel zu umständlich.

Einen grofsen Fortschritt in der Frage des Koli-Nachweises haben wir meines Erachtens Eijkmann(10) zu verdanken, der die Fähigkeit der Kolibazillen, noch bei 46° üppig zu gedeihen, betont und diese zusammen mit dem Zuckervergärungsvermögen als Versuchsbasis benutzt hat. Vor ihm haben bereits Vincent (s. o.) und v. Freudenreich (s. o.) eine Temperatur von 42° angewandt. Rodet(11) hat für Typhusisolierung ein Verfahren angegeben, das die Temperatur von 45—45,5° erfordert, hat aber auch bereits darauf hingewiesen, dafs die Ermittelung des Temperaturmaximums für alle Bakterien ein ausgezeichnetes Mittel zu ihrer Identifizierung sei. Eijkmann setzt Gärungskölbchen mit dem zu untersuchenden Wasser an, dem er durch Zusatz einer Vorratslösung einen Gehalt von ca. 1% Traubenzucker, 1% Pepton und 0,5% Kochsalz verleiht, und bebrütet sie bei 46°. Bei verunreinigtem Wasser findet er nach 24 Stunden Bact. coli in Reinkultur, oder wenigstens in überwiegender Mehrheit, die gesamte Flüssigkeit diffus getrübt und mehr oder weniger, aber stets deutliche Gasbildung. Bei reinem Wasser bleibt die Flüssigkeit meist klar, um höchstens nach 2 mal 24 Stunden nur im offenen Schenkel und dem daran grenzenden Teil des geschlossenen Schenkels eine leichte Trübung, aber keine Gasbildung zu zeigen.

Das Verfahren hat den Vorzug, einfach und leicht ausführbar zu sein; die Frage ist nur die: ist es hinreichend experimentell gestützt, um von vornherein als einwandsfrei zu gelten. Das ist nun zunächst nicht der Fall und zwar aus dem Grunde, weil wir kein absolutes Kriterium für den echten Kolibazillus haben. Es bleibt also nichts übrig, als die praktische Leistungsfähigkeit der Methode an einer möglichst grofsen Anzahl von Wässern zu erproben, deren Verhältnisse bekannt sind, und einen Rückschlufs auf den Wert der Methode erlauben. In diesem Sinne hat uns Eijkmann bereits ein beachtenswertes Material geliefert. In sämtlichen »unverdächtigen« Wassersorten

wurde 46° Gärung auch bei gröfseren Versuchsmengen (300 ccm) niemals, bei »verdächtigen« auch in Bruchteilen eines Tropfens stets gefunden. Ferner zeigten 2 Wässer, die vor Verunreinigung mit menschlichen Fäces geschützt waren, sonst aber sowohl offensichtlichen Schmutz (Entengrün, Laub, Insektenlarven) als auch eine reiche mikroskopische Fauna und Flora erkennen liefsen, in mehrfachen Untersuchungen negativen Ausfall der Probe.

Von den Berliner Wässern, die ich mit dieser Methode oder vielmehr mit denen ich die Methode prüfte, zeigten die verunreinigten stets positiven Ausfall, meist noch, wenn ich dem Versuch winzige Quantitäten unterzog. Ich stellte mir zu diesem Zweck »Verdünnungen« mit sterilem Wasser von 1 : 100, 1 : 1000, je nach Bedürfnis her und tat hiervon 0,01, 0,02 ccm etc. zu der Zuckerbouillon je eines Gärungskölbchens. Dafs die Berliner Kanaljauche noch in riesigen Verdünnungen Gärung geben würde, war von vornherein anzunehmen, und tatsächlich konnte ich bei 0,000001 ccm noch stets das Phänomen beobachten. Aber auch das Rieselwasser, das bereits in den Rieselfeldern filtriert ist, enthält noch bei 0,0001 ccm regelmäfsig Kolibakterien. Ebenso geben 0,001 ccm Spreewasser und 0,0002 ccm Wasser der Panke stets einen positiven Ausfall der Probe. Bei gröfseren Verdünnungen trat auch wohl noch hier und da Gärung auf, doch nicht mehr regelmäfsig.

Unsere einwandsfreien Wässer dagegen, das Berliner Leitungswasser und mehrere gute Brunnen, gaben niemals 46° Gärung auch bei Verwendung gröfserer Mengen (bis 100 ccm und darüber). Ich glaubte hierbei im allgemeinen von der Verwendung gröfserer Versuchsmengen als 100 ccm absehen zu dürfen, da dieselbe tatsächlich überflüssig ist. Ich bin sogar der Ansicht, dafs für den praktischen Zweck ein Versuch mit 10—20 ccm vollständig ausreichen würde, einmal deswegen, weil ich niemals gesehen habe, dafs in einer gröfseren Zahl von Kubikzentimetern noch Koliwachstum aufgetreten wäre, wenn in 1 ccm keines mehr zu konstatieren war, und anderseits, weil obenerwähnte Untersuchung von Clark und M'Gage gezeigt hat, dafs mit dem

Verschwinden der Kolibakterien aus 1 ccm Wasser — festgestellt durch gewöhnliche Plattenuntersuchung — die Verunreinigung aufgehört hatte. Das Bacterium coli entwickelt eben auch bei niederer Temperatur und mäfsigen Nahrungsbedingungen noch so viel Wachstumsenergie, dafs es in 1 ccm Wasser gefunden werden mufs, wenn es nur in der den geringsten Grad der Verunreinigung anzeigenden Menge vorhanden ist. Die 100fache Menge scheint mir Sicherheit genug zu verbürgen, und die Methode hat sich als fein genug erwiesen, um jeden einzelnen Kolibazillus abzufangen. Die Verwendung gröfserer Quantitäten würde einen gröfseren Apparat erfordern, während man ca. 100 ccm nach Eijkmanns Methode mit Pepton, Traubenzucker und Kochsalz versetzt und auf ca. 10 Gärungskölbchen verteilt.

Beim positiven Ausfall des Versuchs fand ich stets nach 24 Stunden diffuse Trübung des gesamten Kolbeninhalts und meist reichliche Gasbildung. Nur sehr selten war die Gasbildung so gering, dafs eine Verwechslung mit der Luftblase, welche von im Wasser absorbiert gewesenen Gasen stammt, möglich gewesen wäre; doch löste eine zuckerlose Kontrolle stets etwaigen Zweifel. In den bei weitem meisten Fällen fanden sich im hängenden Tropfen mehr oder weniger schlecht bewegliche Stäbchen, die die Charakteristica des Bacterium coli zeigten. Mitunter fanden sich auch einzelne wenige Diplo-, Strepto- und Staphylokokken. Beim Ausstrich auf Agarplatten wurden mäfsig viel Koli Kolonien, mitunter einige Staphylokokken-Kolonien gefunden. Ein grofser Teil der Kolibakterien sowie manche Kokkenarten scheinen durch die Säurebildung vergiftet zu werden, wie dies Smith(12) sowohl für Kolibazillen als auch Staphylokokken als möglich nachgewiesen hat. Einen Buttersäurebazillus habe ich niemals gefunden.

Bei negativem Ausfall bleibt die Flüssigkeit fast immer steril; mitunter bildet sich nach 2 Tagen eine geringe Trübung im offenen Schenkel des Gärungskölbchens, meist mit Kamhautbildung; man findet dann gröfstenteils Heubazillen, mitunter ein paar Kokkenarten.

Um auch zweifelhafte Wässer zu prüfen, wählte ich einige Brunnen in der Stadt, vor denen die Polizei durch die Aufschrift »Kein Trinkwasser« warnt. Aus welchem Grunde diese Brunnen im einzelnen eine solche Aufschrift nötig gemacht haben, konnte ich noch nicht feststellen; wahrscheinlich ist dies aber geschehen, weil ihr Wasser nicht sehr rein im physikalischen Sinne ist; es zeigt etwas Bodensatz und eine gelbliche Trübung, ohne einen unangenehmen Geruch oder Geschmack zu besitzen. Alle diese Wässer zeigten bei mehrfacher Untersuchung zu verschiedenen Zeiten niemals 46° Gärung, besonders auch nicht nach einem wolkenbruchartigen Regen und an einem Regentage. Dagegen zeigten 2 dieser Wässer bei niederer Temperatur starke Gärung.

Es ist dies dieselbe Beobachtung, die Eijkmann bei einer grofsen Anzahl tatsächlich unverdächtiger Wassersorten, z. B. in sterilem Fafs aufgefangenem Regenwasser, gemacht hat, dafs nämlich dieselben bei Zimmer- oder gewöhnlicher Bruttemperatur (37°) Gärung geben, welche von Bakterien der weiteren Koligruppe herrührt.

Wenn hier jemand einwenden wollte, auch diese Bakterien, die bei 37° noch wachsen, bei 46° aber nicht mehr, seien wertvoll als Anzeichen gefahrdrohender Verunreinigung, so mufs dem widersprochen werden. Die im hiesigen Institut vorhandenen Kolistämme, sowie eine Anzahl besonders aus Fäces von Erwachsenen, Kindern, Kaninchen, Meerschweinchen, Kanarienvögeln etc. isolierten Stämme gaben sämtlich 46° Gärung. Es scheint also, dafs sämtliche Mikroben der Koligruppe, die aus dem Warmblüterorganismus stammen, bei 46° noch ausgezeichnet gedeihen können, während z. B. die vom Frosch stammenden Darmbakterien bei 37° noch Traubenzucker vergären, bei 46° aber nicht. Auch die des Fisches scheinen, wie Eijkmann unter Zitierung einer Inauguraldissertation ([13]) erwähnt, bei höherer Temperatur nicht mehr kultivierbar zu sein. Von sonstigen Bakterien, die eine Täuschung durch Vergärung bei 46° hervorrufen könnten, kommt wohl keiner, auch der gewöhnliche Buttersäurebazillus nicht, in Betracht, da dieser in Zuckerbouillon erst

nach 2 Tagen ganz spärlich im geschlossenen Schenkel zu wachsen anfängt, wenn er überhaupt angeht. Ihn kann man ausschalten, wenn man die Probe nur auf 24 Stunden ausdehnt, was nach meiner Erfahrung vollständig ausreicht.

Versuche mit Vergärung des Milchzuckers bei sonst gleicher Versuchsanordnung haben dasselbe Resultat wie Glykosegärung gegeben, einen Vorteil eines der beiden Verfahren habe ich nicht feststellen können.

Es besteht m. E. ein Vorzug der Gärungsprobe bei 46° darin, dafs sie Verunreinigungen durch Kaltblüterfäces nicht anzeigt. Man kann ein Wasser nicht immer vom Genufs ausschliefsen, blofs weil Fische oder Frösche sich in ihm aufhalten. Wer einen höheren Grad der Reinheit verlangt, kann ja weitere Untersuchungen anstellen, jedenfalls wird er vorher zu konstatieren vermögen, dafs eine direkte Gefahr durch den Genufs nicht besteht.

Meinem hochverehrten Chef, Herrn Geheimrat Rubner, erlaube ich mir für die Anregung zu der Arbeit und sein Interesse an derselben meinen gehorsamsten Dank zu sagen.

Literatur.

1. Clark und M'Gage, Ref. Centralbl. f. Bakteriol., 1900.
2. Kruse, Zeitschrift f. Hygiene u. Infektionskrankh., XVII.
3. Weifsenfeld, Zeitschrift f. Hygiene u. Infektionskrankh., XXXV.
4. v. Freudenreich, Centralbl. f. Bakteriol. u. Parasitenk., XVIII.
5. Schardinger, Centralbl. f. Bakteriol., XVI.
6. Abbe, Centralbl. f. Bakteriol., XIX.
7. Houston, 2nd Report of the Royal Comm. on sewage disposal (Wyman et Sons, London 1902), zitiert nach Eijkmann.
8. Petruschky und Pusch, Zeitschrift f. Hygiene, XLIII.
9. Levy und Bruns, Archiv f. Hygiene, XXXVI.
10. Eijkmann, Centralbl. f. Bakteriol., XXXVII.
11. Rodet, Compt. rend. Acad. soc. de biologie. Ref. Centralbl. f. Bakt., VI.
12. Smith, Centralbl. f. Bakteriol., XVIII.

Sind bei der bakteriziden Wirkung des Blutserums osmotische Vorgänge im Spiele?

Von

Dr. **Georg Leuchs.**

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität München. Vorstand: Prof. Max Gruber.)

Gegen die Lehre, dafs die bakterizide Wirkung des Blutserums auf die Anwesenheit besonderer bakterienfeindlicher Stoffe, der Alexine, zurückzuführen sei, wurde seinerzeit der Einwand erhoben, dafs der schroffe Wechsel des Mediums bei der Übertragung der Bakterien von dem künstlichen Nährboden in das Serum eine Schädlichkeit sei, die für sich allein völlig genüge, den Tod der Keime herbeizuführen. Einerseits der Hunger, andrerseits osmotische Vorgänge seien die Ursachen ihres Absterbens.

Dieser Einwand ist durch die Untersuchungen von Buchner, Trommsdorff, Hegeler und v. Lingelsheim widerlegt worden. Die Verschiedenheit des osmotischen Druckes von Nährboden und Serum wie der Hunger spielen keine Rolle bei der Abtötung der Bakterien durch frisches Serum; die Annahme besonderer, leicht zerstörbarer bakterizider Substanzen im frischen Blutserum ist unvermeidlich.

Dagegen schien doch manches darauf hinzudeuten, dafs bei der Abtötung der Bakterien durch frisches Immunserum osmotische Vorgänge im Spiele seien. Die osmotische Hüllschichte der Keime, welche in normalem Zustande als semipermeable Membran angesehen werden mufs, konnte möglicherweise durch die Präparatoren (Amboceptoren) der Immunsera

derartig verändert werden, dafs sie nun nicht mehr blofs Wasser, sondern auch andere wasserlösliche Substanzen durchtreten liefse und so einerseits dem Alexin den Eintritt erleichterte, andrerseits den Austritt von Salzen und anderen lebenswichtigen Substanzen aus dem Innern der Zelle ermöglichte, was den Tod der Bakterien zur Folge hätte. Gruber, der diese Ansicht verfocht, führte dafür ins Feld, dafs die Vorgänge der Bakteriolyse, wie man sie z. B. beim Pfeifferschen Versuch beobachten kann, entschiedene Ähnlichkeit zeigen mit den Veränderungen der Zellen bei Störungen der normalen Osmose, dafs ferner bei der der Bakteriolyse analogen Hämolyse nichts anderes zu konstatieren sei als Diffusion des Hämoglobins aus dem Stroma der Blutscheiben in die umgebende Flüssigkeit unter Zurücklassung der »Schatten«.

Auf die Richtigkeit dieser Ansicht liefs sich die Probe machen: wenn die Immunkörper die Beschaffenheit der osmotischen Membran verändern, so mufsten die damit behandelten Zellen sich gegen Änderungen des osmotischen Druckes in ihrem Medium anders verhalten als die normalen. Auf Veranlassung von Herrn Prof. Gruber habe ich daher zur selben Zeit, als Röfsle seine in der »Münchner mediz. Wochenschrift«, Jahrg. 1904, Nr. 42, veröffentlichten Untersuchungen über das osmotische Verhalten der mit Immunkörpern behandelten Erythrocyten begann, Versuche über den Einflufs der Immunkörper auf die Abtötung der Bakterien durch destilliertes Wasser begonnen. Über einen Teil der Resultate dieser Versuche habe ich bereits in der Sitzung der Gesellschaft für Morphologie und Physiologie in München, am 22. November 1904, berichtet. Es sei gestattet, das Wichtigste aus meinen Versuchsprotokollen hier anzuführen.

Bevor das Verhalten der mit Immunserum vorbehandelten Bakterien gegen destilliertes Wasser untersucht werden konnte, mufste die Widerstandsfähigkeit der normalen Bakterien ermittelt werden. Da sich die gewöhnlichen Typhusbakterien als sehr resistent gegen destilliertes Wasser erwiesen (selbst bei schwachen Einsaaten war das infizierte Wasser nach einem

Monat noch nicht steril), so wurden die Versuche mit Vibrio Danubicus angestellt. Dabei zeigte sich, dafs bei der Übertragung der Keime aus einer 20—24stündigen Agarkultur (Agar mit dem gebräuchlichen Zusatz von 0,5% Kochsalz) in destilliertes Wasser schon binnen 5 Minuten Massentod eintritt. 90 bis 95% der eingesäten Keime gehen fast sofort zugrunde und nur 5—10% überleben. Auch 0,3 und 0,66 proz. Kochsalzlösungen schädigen die Danubicuskeime in hohem Mafse. Auch in diesen Lösungen sterben etwa 50% der eingesäten Keime binnen 5 Minuten. Ich will nur einen einschlägigen Versuch mit allen Einzelheiten mitteilen:

Von einer 24stündigen Agarkultur wurden 4 Ösen, deren Füllung durch Wägung des Agarröhrchens vor und nach der Entnahme der Öse festgestellt wurde, entnommen und in 50 ccm destilliertes Wasser, bzw. 0,3 proz. Kochsalzlösung, 0,66 proz. Kochsalzlösung, Bouillon verteilt. (Die Ösen wurden vom Rande des Bakterienbelags entnommen, da anzunehmen ist, dafs im Innern desselben sehr viele tote Keime vorhanden sind. Das Agarröhrchen wurde in abgekühltem Zustand, mit einer Kautschukkappe bedeckt, gewogen.) Aus diesen Aufschwemmungen wurde, ohne dafs sie filtriert worden wären, sofort (d. h. nach weniger als 5 Minuten) 1 ccm übertragen in ein mit 50 ccm Peptonwasser (0,5% Kochsalz + 0,1% Pepton, s. u.) gefülltes Verdünnungstropfgläschen[1]), von welchem aus einerseits je 1 Tropfen ausgesät wurde auf 3 Gelatineplatten (»grofse Aussaat«), andrerseits 4 Tropfen gegeben wurden in ein zweites, 50 ccm Peptonwasser enthaltendes Verdünnungstropfgläschen, von dem aus je 5 Tropfen auf 3 Gelatineplatten ausgesät wurden (»kleine Aussaat«). Die Platten der grofsen Aussaat wurden mikroskopisch (16 oder 32 Gesichtsfelder), die der kleinen Aussaat wurden direkt gezählt. Dafs die Berechnung hier, wie bei den späteren Versuchen, für die grofse Aussaat in der Regel eine geringere

1) Nach Fickers Vorgang (Zeitschr. f. Hyg., Bd. 29) benutzte ich, um genau gleich grofse Quantitäten entnehmen zu können, Tropfgläschen. Die Tropfengröfse jedes einzelnen Tropfgläschens für die benutzten Lösungen (dest. Wasser, Peptonwasser, Bouillon, Kochsalzlösung) bestimmte ich durch wiederholtes Zählen der Tropfen, welche notwendig waren, um 10 ccm zu füllen.

Keimzahl ergibt als für die kleine, erklärt sich ohne weiteres daraus, dafs in einer direkt besäten Platte viele Kolonien aus zwei oder mehr Keimen entstehen.

	Kolonienzahl, Mittelwert aus je 3 Platten		Keimzahl auf 1 mg Kultur berechnet aus der	
	grofse Aussaat	kleine Aussaat	grofsen Aussaat	kleinen Aussaat
Bouillon	24 600	933	180 000 000	290 000 000
0,66 proz. Kochsalz .	12 311	722	68 000 000	147 000 000
0,3 proz. Kochsalz . .	14 711	466	96 000 000	127 000 000
Destill. Wasser . . .	2 942	81	13 400 000	14 500 000

Jene Keime, welche den ersten Ansturm überstanden haben, halten dann viel länger lebend aus. Es ist sehr wahrscheinlich, dafs dies zum Teil darin begründet ist, dafs sie durch die in Lösung gegangenen Leibesbestandteile ihrer unglücklicheren Brüder eine gewisse Stärkung oder Schutz erhalten. Wenigstens ist es sehr auffallend, wie grofs der Einflufs ist, welchen die Zahl der eingesäten Bakterien auf die Schnelligkeit des Absterbens besitzt: Bringt man viele Bakterien in die schädigende Flüssigkeit, so erfolgt das Absterben der Keime verhältnismäfsig viel langsamer, als wenn man nur wenige Bakterien einsät, eine Tatsache, die bereits von zahlreichen Forschern konstatiert worden ist. Zur Bestätigung des eben Gesagten sei daher nur ein Beispiel angeführt:

Ich schwemmte 5 Osen einer 20stündigen Agarkultur von Vibrio Danubicus in 5 ccm destilliertem Wasser auf, filtrierte die Aufschwemmung durch ein Leinwandfilter und stellte nun wie bei der Agglutinationsprobe fünf verschiedene Verdünnungen derart her, dafs je 1 ccm der verschiedenen Probeflüssigkeiten den 40., 1600., 64000., 2560000., 102400000. Teil einer Kulturöse enthielt. Hiervon entnahm ich von Zeit zu Zeit Proben und zwar, um zählbare (Gelatine-) Platten zu bekommen, von dem letzten Tropfgläschen 12 Tropfen, von dem 3. und 4. 1 Tropfen und von den ersten beiden $^1/_{500}$ Tropfen, d. h. ich verdünnte den entnommenen Tropfen mit physiol. Kochsalz-

lösung auf das 500 fache und brachte erst von dieser Flüssigkeit 1 Tropfen in die Gelatine.

a) Kolonienzahl (Mittelwert aus je zwei Platten):

Grad der Verdünnung der Öse	40	1 600	64 000	2 560 000	102 400 000
Aussaat in die Gelatine, Tropfen:	$^1/_{500}$	$^1/_{500}$	1	1	12
Nach weniger als 5 Min.	5 900	100	780	16	9
» 1 Stunde	2 350	45	5	1	2
» $3^1/_2$ Stunden . . .	2 950	17	0	0	0
» 1 Tag	12	0	0	0	0
» 2 Tagen	23	1	0	0	0
» 17 » (12 Tropfen!)	0	0	0	0	0

b) Berechnung: 1 ccm der Probeflüssigkeit enthielt Keime:

Grad der Verdünnung der Öse	40	1 600	64 000	2 560 000	102 400 000
Nach weniger als 5 Min.	33 000 000	570 000	8 970	189	9
Nach 1 Stunde	13 200 000	252 000	58	12	2
» $3^1/_2$ Stunden . . .	16 500 000	95 200	0	0	0
» 1 Tag	67 200	0	0	0	0
» 2 Tagen	128 800	5 700	0	0	0
» 17 »	0	0	0	0	0

Es ist also wohl zu beachten, dafs nach dem Mitgeteilten die folgenden Versuche über den Einflufs der Immunkörper nur an den widerstandsfähigeren Individuen der verwendeten Kulturen angestellt werden konnten.

Nachdem ich mich durch den Versuch überzeugt hatte, dafs die von mir verwendeten Sera (inaktiviertes Meerschweinchen-Immunserum und -Normalserum) in 1 proz. Verdünnung die Vermehrung der Keime in gleicher Weise beeinflufsten, ging ich dazu über, mittels der Plattenmethode zu prüfen, ob mit Immunkörper beladene Bakterien in destilliertem Wasser schneller zugrunde gehen als solche, welche nur mit inaktiviertem Normalserum oder gar nicht vorbehandelt waren.

Von einer 22 stündigen Agarkultur von Vibrio Danubicus wurden 4 Ösen = 12,8 mg entnommen, und in 200 ccm 0,3 proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Von dieser Aufschwemmung

wurden 49,5 ccm versetzt mit 0,5 ccm Meerschweinchen-Immunserum, welches bei Verdünnung 1 : 320 noch deutliche Agglutination zeigte, ferner 49,5 ccm mit 0,5 ccm inaktiviertem Meerschweinchen-Normalserum. Diese Mischungen nebst 50 ccm der Originalaufschwemmung kamen für 1 Stunde in den Eisschrank, um die vollständige Bindung der Immunkörper herbeizuführen. Darauf wurde von den drei Flüssigkeiten nach kräftigem Schütteln je $^1/_2$ ccm entnommen und in Tropfgläschen gebracht, welche mit 49,5 ccm destilliertem Wasser gefüllt waren. Aus diesen wurde nun sofort und später nach bestimmten Zeiten je ein Tropfen entnommen und in Gelatine gebracht (»grofse Aussaat«), ferner wurden vier Tropfen gegeben in ein mit 50 ccm Pepton-Kochsalzlösung gefülltes Verdünnungstropfgläschen, aus diesem wieder je fünf Tropfen in drei Gelatineröhrchen (»kleine Aussaat«). Natürlich wurde vor jeder Entnahme von Tropfen geschüttelt, um gleichmäfsige Verteilung der Keime zu bewirken. (Als Verdünnungsflüssigkeit für die dem destillierten Wasser entnommenen Proben wurde hier wie später eine Lösung von 0,1 proz. Pepton und 0,3 proz. Kochsalz in Wasser benutzt, eine Flüssigkeit, welche höchstens nur eine ganz langsame Vermehrung der eingesäten Danubicuskeime zulassen dürfte, und welche anderseits, wie ich vorher durch einen besonderen Versuch festgestellt hatte, diesen Keimen bei kurzer Einwirkungsdauer nicht schädlich ist.) Das Resultat, berechnet auf 1 ccm des destillierten Wassers, war folgendes:

1 ccm des destillierten Wassers enthielt Keime:

	Berechnet aus der kleinen Aussaat			Berechnet aus der grofsen Aussaat		
	Immunserum	Normalserum	Kochsalzlösung	Immunserum	Normalserum	Kochsalzlösung
Sogleich . . .	136 000	115 000	111 000	88 400	93 800	68 300
Nach 1 Stunde	78 000	91 000	62 000	60 300	56 300	39 000
» $3^1/_2$ Std.	47 000	64 000	23 000	52 300	—	32 500
» 1 Tag .	10 900	2 180	227	7 300	1 500	39
» 3 Tagen .	—	—	—	2 350	0	0
» 6 » .	—	—		94	0	0
» 8 » .	—	—	—	4	—	—

Die mit Normalserum vorbehandelten Bakterien starben also im destillierten Wasser nahezu ebenso schnell ab wie die nur mit 0,3% Kochsalz vorbehandelten. Die geringe Differenz in der Resistenz erklärt sich wohl aus dem Umstande, dafs mit den mit Serum vorbehandelten Bakterien gleichzeitig eine geringe Menge (0,005 ccm) Normalserums in das destillierte Wasser eingetragen wurde, so dafs das Wasser eigentlich eine 0,01 proz. Serumlösung darstellte. Dagegen starben die mit Immunserum vorbehandelten Bakterien deutlich langsamer ab als die mit Normalserum vorbehandelten. Dies mufs jedoch nicht auf einer tatsächlichen gröfseren Resistenz der ersteren beruhen, sondern kann vorgetäuscht sein durch Agglutination, indem die in Agglutinationshäufchen eingeschlossenen Bakterien lange Zeit vor dem destillierten Wasser geschützt sein könnten. Gegen letzteres spricht nicht, dafs nach Bordet die Agglutinationshäufchen im destillierten Wasser durch Schütteln zerfallen, denn es handelt sich hier, wie eben erwähnt, eigentlich nicht um destilliertes Wasser, sondern um eine 0,01 proz. Serumlösung. Wohl aber spräche dagegen der Umstand, dafs die Kolonienzahlen der Kontrollplatten bei der »kleinen Aussaat« sehr gut zusammenstimmen.

Es wurde nun der Versuch wiederholt mit der Modifikation, dafs nach erfolgter Bindung der Immunkörper das Serum durch mehrmaliges Waschen der Bakterien mit 0,3 proz. Kochsalzlösung entfernt wurde, um den Einflufs der Nährstoffe des Serums möglichst auszuschalten. Um die Vermehrung der Keime während des Zentrifugierens zu verhindern, wurde mit Eiskühlung zentrifugiert. Ferner wurde die Serumwirkung verstärkt, indem eine Serumverdünnung von 1 : 15 gewählt wurde. Um den durch das Waschen entstehenden Keimverlust auszugleichen, wurde eine gröfsere Aussaat gemacht.

(Siehe die Tabelle auf S. 403)

Wie die Tabelle zeigt, sind die Differenzen in der Keimzahl von Anfang an so grofs gewesen, dafs bestimmte Schlüsse unzulässig wären. Da sich herausstellte, dafs die wesentlich schlechter abzuzentrifugierenden Normalserumbakterien beim Waschen zum gröfsten Teil weggeschüttet werden, so blieb nichts übrig, als

Keimzahl pro 1 ccm dest. Wassers (Mittelwerte, berechnet aus grofser und kleiner Aussaat):

	Immunserum	Normalserum	0,3 % Kochsalz
Zahl der in das destill. Wasser eingetragenen Bakterien pro 1 ccm desselben	650 000	19 000	1 000 000
Nach 2—5 Minuten	486 000	2 000	776 000
» 1 Stunde	450 000	1 500	691 000
» 3 Stunden	300 000	270	227 000
» 6 »	435 000	189	209 000
» 1 Tag	57 000	12	22 000
» 2 Tagen	5 100	0	1 500
» 3 »	4 100	0	339
» 4 »	925	—	83

von vornherein eine bedeutend gröfsere Menge von Bakterien für die Normalserumprüfung zu verwenden, sowie gründlicher zu zentrifugieren. Dies ist im folgenden Versuch geschehen.

Von einer 22stündigen Danubicusagarkultur wurden aufgeschwemmt:

1 Öse in 7,0 ccm einer 0,3proz. Kochsalzlösung + 1/2 ccm Immunserum
5 Ösen » 7,0 » » » » + 1/2 » inakt. Normals.
1 Öse » 7,5 » » » »

Diese Aufschwemmungen kamen auf 1 Stunde in den Eisschrank, worauf die beiden Serumaufschwemmungen 1/2 Stunde mit Eiskühlung zentrifugiert wurden. Nun wurde die Flüssigkeit vollständig abgegossen, das Sediment aufgerührt, 7 ccm 0,3proz. Kochsalzlösung zugegeben und mit dem Sediment verrührt. Nach weiterem 1/4stündigem Zentrifugieren wurde zum Bodensatz soviel 0,3proz. Kochsalzlösung gegeben, dafs die Trübung in beiden Gläschen ungefähr gleich stark schien, d. h zu den Immunserumbakterien 10 ccm, zu den Normalserumbakterien 2 ccm. Um gröfsere Agglutinationshäufchen zu entfernen, wurden beide Proben durch ein Leinwandfilter filtriert in Tropfgläschen, hier stark geschüttelt, und nun wurden von allen drei Aufschwemmungen (die reine Kochsalzaufschwemmung war unterdessen im Eisschrank gestanden) 7 Tropfen = 1/2 ccm in 50 ccm destilliertes Wasser gebracht. Von diesem wurde von Zeit zu Zeit je 1 Tropfen direkt in zwei Gelatineröhrchen übertragen (»grofse Aussaat«),

andrerseits 4 Tropfen in 50 ccm Peptonwasser und hieraus je 5 Tropfen in 2 Gelatineröhrchen (»kleine Aussaat«). Von der Abnahme der Kultur bis zum ersten Plattengufs vergingen $2^1/_2$ Stunden. Um den Keimgehalt der Aufschwemmungen im Moment der Mischung mit dem destillierten Wasser zu bestimmen, wurden gleichgrofse Proben statt in letzteres in Peptonwasser gegeben und in ganz entsprechender Weise zu Platten verarbeitet.

Keimzahl pro 1 ccm des destillierten Wassers:

	Berechnet aus der kleinen Aussaat			Berechnet aus der grofsen Aussaat		
	Immunserum	Normalserum	0,3 % Kochsalz	Immunserum	Normalserum	0,3 % Kochsalz
Im Moment der Eintragung .	56 000	580 000	2 080 000	40 000	242 000	unzählbar
Sogleich darnach	77 000	416 000	718 000	62 000	122 000	unzählbar
Nach 1 Stunde	72 000	229 000	693 000	61 000	115 000	258 000
» $3^1/_2$ Std. .	17 600	210	12 600	22 300	72	10 600
» 6 » .	225	0	0	864	6	84
» 1 Tag .	0	0	0	0	0	0
» 2 Tagen .	0	0	0	0	0	0
» 3 » .	—	—	—	0	0	0

Obwohl also hier von den Immunserumbakterien zehnmal weniger in das Wasser eingetragen wurden als von den Normalserumbakterien und 40 mal weniger als von den unvorbehandelten Bakterien, so erfolgte doch die Abnahme der Keimzahl bei ersteren langsamer als bei den beiden letzteren. Dies mufs jedoch keineswegs als Beweis für eine gröfsere Resistenz der Immunserumbakterien angesehen werden. Der Einflufs der Nährstoffe ist zwar durch das Waschen ausgeschaltet, wie ja auch das gleiche Verhalten der Normalserum- und der unvorbehandelten Bakterien beweist; dagegen sprechen mehrere Momente dafür, dafs die langsamere Abtötung der Immunserumbakterien doch auf die schützende Wirkung kleiner Agglutinationshäufchen zurückzuführen ist:

Vergleicht man nämlich diesen Versuch mit dem vorhergehenden, so findet man, dafs im einen Falle, wo filtriert wurde, also gröfsere Agglutinationshäufchen zurückgehalten wurden, schon nach einem Tage in sämtlichen Proben Sterilität eingetreten war; im anderen Falle dagegen wurde nicht filtriert, hier waren noch

nach vier Tagen viele Immunserumkeime entwicklungsfähig. Aufser der Filtration aber bot die Ausführung beider Versuche keine prinzipiellen Unterschiede. Sind somit gröfsere Agglutinationshäufchen imstande, die in ihrem Innern liegenden Bakterien tagelang vor der tötenden Wirkung des destillierten Wassers zu bewahren, so darf angenommen werden, dafs auch kleinere Häufchen, welche noch durch ein Leinwandfilter hindurchgehen, eine gewisse schützende Wirkung ausüben können, wenn auch nur für einige Stunden.

Dafs tatsächlich in der Immunserumaufschwemmung auch nach der Filtration noch kleine Agglutinationshäufchen vorhanden waren, und dafs sich diese teilweise nach dem Einbringen in das Wasser wieder auflösten, dafür scheinen die beiden ersten Zahlenreihen der Tabelle zu sprechen: Bei den Normalserum- und den unvorbehandelten Bakterien ist sofort nach der Eintragung in das destillierte Wasser eine Abnahme der Keimzahl zu beobachten (von 580000 auf 416000 und von 2000000 auf 718000), worin sich die rapid einsetzende deletäre Wirkung des Wassers dokumentiert. Bei den Immunserumbakterien aber tritt sogar eine Steigerung der Keimzahl ein, welche sich wohl nur dadurch erklären läfst, dafs ein Teil der Agglutinationshäufchen sich aufgelöst hat und zahlreiche Keime frei geworden sind.

Ist somit die scheinbar gröfsere Resistenz der mit Immunserum vorbehandelten Bakterien wohl nur auf den störenden Einflufs der Agglutination zurückzuführen, so geht aus den Zahlen der Tabelle doch auch soviel hervor, dafs die Widerstandsfähigkeit dieser Bakterien gegen destilliertes Wasser keineswegs vermindert ist.

Das Ergebnis meiner Versuche ist somit ein negatives. Es liefs sich keine gröfsere Hinfälligkeit der mit Immunkörpern präparierten Danubicuskeime gegen osmotische Schädlichkeiten erweisen. Der Gedanke, dafs Veränderungen in den osmotischen Verhältnissen das Entscheidende bei der Bakterizidie seien, mufs also wohl fallen gelassen werden, wenn auch zugegeben werden mufs, dafs die Umstände der Agglutination und des raschen Massentodes der empfindlichen Keime bei der Übertragung der Kultur in die Aufschwemmungsmedien für meine Versuche recht störend waren.

Röfsles Versuche an Erythrozyten haben bekanntlich für diese das gleiche Resultat ergeben, dafs ihr osmotischer Zustand durch die Immunkörper nicht merklich verändert wird.

Ich untersuchte auch mikroskopisch, ob mit Immunkörpern beladene Bakterien in bezug auf Plasmolyse sich anders verhalten als unvorbehandelte Bakterien. Verwendet wurden hierzu: Bacterium typhi, pyocyaneum und megatherium. Ich konnte irgendeinen Unterschied in bezug auf den Eintritt und die Dauer der Plasmolyse nicht beobachten, stiefs jedoch sehr bald auf jene Erscheinung, die Alfred Fischer[1]) entdeckt und als »Plasmoptyse« bezeichnet hat.

Fischer beobachtete nach gewissen Vorbereitungen im hängenden Tropfen aufserhalb der Bakterienleiber eigentümliche kugelartige Gebilde, stärker lichtbrechend als die Flüssigkeit des Tropfens, im Inneren vollkommen homogen, von wechselnder Gröfse, den Querdurchmesser der Bakterien meist weit übertreffend. Ihr Kontur ist deutlich, aber zart, ihre Form ist nicht immer kreisrund, sondern manchmal oval, birnförmig oder ganz unregelmäfsig. Oft liegen die Kugeln der Seite der Bakterien an. Sie finden sich in der Regel nicht von Anfang an im Hängetropfen vor, sondern entstehen erst im Laufe von Minuten und Stunden.

Fischer fafste die Kugeln auf als Plasmateile der Bakterien, welche von diesen ausgestofsen, ausgespieen sein sollten. Er nannte den Vorgang des Ausspeiens Plasmoptyse und erklärte ihn auf folgende Weise:

Werden Bakterien in 2proz. Kochsalzlösung gebracht, so tritt infolge Steigerung des osmotischen Aufsendruckes Plasmolyse ein, d. h. man beobachtet das Auftreten von stärker lichtbrechenden und stärker färbbaren Kügelchen, Bändern oder Klümpchen innerhalb der Bakterienmembran. Um die Plasmolyse der Bakterien zu verstehen, hat man sich nach Fischer die Bakterienzelle ebenso gebaut vorzustellen, wie die Zelle der höheren Pflanzen, also ausgestattet mit einer Membran, dem Zellsaft und dem Protoplasma, welches letztere einen dünnen,

---

1) Zeitschrift f. Hygiene, 35. Bd.

den Zellsaft einschliefsenden Wandbelag bildet. Für Wasser sind die Membran und das Protoplasma leicht durchgängig, für gelöste Stoffe, z. B. Salzmoleküle jedoch nur die Membran, während der Protoplasmaschlauch mehr oder minder undurchgängig ist (wenigstens bei den »plasmolysierbaren Bakterien«), das Protoplasma ist also, wie der terminus technicus lautet, eine semipermeable Membran. Solange die umgebende Flüssigkeit weniger osmotisch wirksame Stoffe enthält als der Zellsaft, ist daher im Innern der Zelle ein Überdruck vorhanden, welcher den Turgor der Zelle aufrechterhält. Dieser Überdruck hört aber auf, sobald die umgebende Flüssigkeit eine stärkere Konzentration an osmotisch wirksamen Substanzen enthält als der Zellsaft. Jetzt drücken vielmehr die Salzmoleküle von aufsen auf den für sie undurchgängigen Protoplasmaschlauch, es wird Wasser ausgeprefst, das Protoplasma wird entspannt, löst sich teilweise von der Zellmembran ab und zieht sich zusammen, es tritt Plasmolyse ein.

Mit der Zeit aber dringt doch soviel Salz durch die Protoplasmahülle in den Zellsaft ein, dafs der Innendruck den Aufsendruck mehr oder minder kompensiert. Führt man nun diese salzbeladenen und durch Hunger geschwächten Bakterien in eine weniger konzentrierte Lösung, z. B. in Leitungswasser über, so sollte man erwarten, dafs nun das Salz aus der Bakterienzelle wieder austritt, bis der Salzgehalt der Zelle und der dieselbe umspülenden Flüssigkeit gleich ist. Dies geschieht jedoch nicht, da infolge einer den Bakterien überhaupt anhaftenden oder erst im Laufe des Versuches erworbenen Eigenschaft das Salz viel langsamer exosmiert als es endosmiert ist; es bleibt vielmehr der osmotische Innendruck bestehen, während der Aufsendruck plötzlich rapid sinkt, die Membran ist dieser gewaltigen Druckdifferenz auf die Dauer nicht gewachsen, sie reifst an ihrer nachgiebigsten Stelle, in der Regel dem Pol des Bakteriums, ein; durch den Rifs wird ein Teil des Protoplasmas hervorgeprefst, der sich nun in Form einer Kugel, die bald gröfser und matter wird, dem Bakterienpol anlegt, — es tritt Plasmoptyse ein.

Soweit wäre ja die Theorie der Plasmoptyse annehmbar. Die Entstehung dieser Kugeln beobachtete aber Fischer nicht

nur unter den angegebenen Bedingungen, sondern auch unter gerade entgegengesetzten Verhältnissen, d. h. wenn Bakterien von einem 0,15% NaCl enthaltenden Medium in 0,75 proz. oder in 2 proz. Kochsalzlösung oder in eine der letzteren isotonische Flüssigkeit, z. B. 5% Glyzerin übertragen werden. Die Erklärung, welche Fischer für diese, wie er selbst sagt, scheinbar allen osmotischen Gesetzen widersprechende Erscheinung gibt, ist zu kompliziert und zu wenig verständlich, als dafs ich sie hier wiedergeben könnte.

Fischer verwertete die Plasmoptyse hauptsächlich gegen die Alexinlehre. Beim Pfeifferschen Phänomen tritt bekanntlich durch die Wirkung des aktiven Immunserums ein Aufquellen des Bakteriums und schliefslich Umwandlung seiner Protoplasmamasse in eine kleine Kugel ein, welche allmählich abblafst und verschwindet. Fischer hielt diese Kügelchen für identisch mit seinen Plasmoptysekugeln und glaubte infolgedessen auch für die einfache Alexinwirkung die Plasmoptyse als Ursache ansprechen zu müssen.

Durch die früher genannten Forscher ist bereits erwiesen worden, dafs das Pfeiffersche Phänomen keinesfalls mit der Plasmoptyse Fischers identifiziert werden könne; bei meinen Kontrolluntersuchungen stellte sich weiter die überraschende Tatsache heraus, dafs eine Plasmoptyse der Bakterien überhaupt gar nicht existiert, dafs die von Fischer beobachteten Kugeln gar keine Bakterienprodukte sind.

Ich will vorausschicken, dafs ich mehrere hundert hängende Tropfen untersucht habe, jeden mehrmals und so gründlich als möglich. Die Tropfen wurden unter verschiedenen Variationen hergestellt, meist genau nach Fischers Vorschrift. Sie bestanden aus destilliertem Wasser, Leitungswasser, 0,75 proz., 2 proz. oder höherprozentiger Kochsalzlösung oder 5 proz. Glyzerin und enthielten aufgeschwemmt Milzbrand-, Typhus-, Koli-, Pyocyaneus-, Prodigiosus-, Proteus-, Danubicus- oder Cholerabakterien. Die Bakterien waren teils auf gewöhnlichem Agar mit und ohne den gebräuchlichen 0,5 proz. Kochsalzzusatz, teils auf dem von Fischer benutzten Nährboden gewachsen, das Alter der Kultur wechselte von 16 Stunden bis zu 4 Tagen.

Sehr auffällig war zunächst die aufserordentliche Inkonstanz, welche die Kugeln in ihrer Gröfse, in ihrem Auftreten nach Ort, Zahl und Zeit zeigen. So wechselt die Gröfse etwa zwischen 0,5 bis 6 μ, die Zahl, ganz unabhängig von der eingesäten Bakterienmenge, zwischen 0—50 Stück pro Gesichtsfeld. Meist findet man sie nur im Randgebiet des Tropfens oder nur in einzelnen Teilen desselben. Auch bilden sich die Kugeln durchaus nicht nur in 2proz. Lösungen, sondern ebenso auch in 0,75prozentigen und in Wasser, unabhängig davon, ob die Bakterien einem Konzentrationsunterschied ausgesetzt werden oder nicht. Beträchtliche Schwankungen ergeben sich auch in bezug auf den Zeitpunkt, an welchem die Kugeln zuerst sichtbar werden. Fischer beobachtete sie meist schon im Verlauf der ersten Stunde nach Herstellung des Tropfens. Ich konnte sie selten so bald wahrnehmen, meist erst bei der zweiten Untersuchung, nach zwei, drei, oft erst nach vier bis sechs Stunden oder nach einem Tage.

Ferner konnte ich den Vorgang des Ausspeiens des Plasmas — wie anscheinend auch Fischer selbst — niemals beobachten. Dafs die Kugeln oft den Bakterien anliegen, kann man nicht als Beweis ansehen dafür, dafs die Kugeln von den Bakterien ausgestofsen worden sind. Durch die lebhafte Molekular- oder Eigenbewegung der Bakterien können beide Elemente in Berührung kommen, auch kann sich eine Kugel in nächster Nähe einer Stelle bilden, wo sich ein Bakterium befindet. Die kugeltragenden Bakterien sehen auch ganz gesund aus, unterscheiden sich nicht von ihren kugelfreien Genossen, zeigen eventuell wie diese deutliche plasmolytische Schrumpfung und lebhaft zappelnde Bewegung, wie wenn sie sich abmühten, von dem klebrigen Ding wieder loszukommen; wiederholt beobachtete ich Keime, welche mit einer Kugel belastet mit grofser Geschwindigkeit durch das Gesichtsfeld sausten; man kann sich schwer vorstellen, dafs Bakterien, welche einen grofsen Teil ihres Protoplasmas verloren haben, sich noch so lebhaft sollen bewegen können.

Die Färbung der Kugeln mit basischen Anilinfarbstoffen, welche doch möglich sein müfste, wenn es sich um plasmatische Substanz handelte, gelang weder Fischer noch mir. Wieder-

holt gelang es mir, ein Gesichtsfeld mit zahlreichen Kugeln und Bakterien, welches ich abgezeichnet hatte, nach der Eintrocknung und Färbung des Tropfens wieder aufzufinden: Die mit Methylenblau gefärbten Milzbrandfäden, sowie einige Schmutzpartikel waren vollzählig und in ihrer Lage fast unverändert erhalten geblieben, während die Kugeln spurlos verschwunden waren. (Die Fixierung der Deckgläschen war hierbei erreicht worden durch konzentrierte Sublimatlösung, Waschen in Alkohol und Äther.)

Bedeutungsvoller noch ist die Tatsache, dafs sich die Kugeln nur im hängenden Tropfen, nicht z. B. im Reagensglas bilden. Schwemmt man im Reagensglas in einer 2proz. Kochsalzlösung Bakterien auf und entnimmt zu beliebiger Zeit einen Hängetropfen, so kann man bei sofortiger Beobachtung keine Kugeln entdecken, trotzdem doch die Kochsalzlösung lange genug auf die Bakterien hat einwirken können; die Kugeln entstehen erst nach einiger Zeit. Auch Fischer hat dies beobachtet und er hat auch hier eine Erklärung bereit: Die Bakterien, sagt er, sinken in der Salzlösung sehr schnell zu Boden und nehmen hier, dicht beieinander, soviel Salz auf, dafs die am Boden des Probierröhrchens befindliche Salzlösung einen geringeren Prozentgehalt bekommt, bevor noch die zur Plasmoptyse erforderliche Salzmenge in die Bakterien eingedrungen ist. Diese eigentümliche Vorstellung kann man experimentell leicht widerlegen: man braucht nur die Proben nicht vom Sediment, sondern von der überstehenden Flüssigkeit, welche in den ersten Stunden noch viele Bakterien enthält, zu nehmen, oder man kann eine Sedimentierung verhindern, indem man die Röhrchen im Schüttelapparat aufbewahrt. Das Resultat ist immer das gleiche.

Die Plasmoptyse — darüber läfst Fischer keinen Zweifel — kann sich nur an lebenden Bakterien abspielen. Brachte ich nun in einen hängenden Tropfen Milzbrandfäden, welche durch 1stündiges Erhitzen auf 70° getötet waren, (drei damit besäte Platten blieben steril), so traten trotzdem die Kugeln auf.

Schliefslich überzeugte ich mich, dafs zur Kugelbildung die Anwesenheit von Bakterien überhaupt nicht erforderlich ist, sondern dafs die Kugeln auch im bakterienfreien Hänge-

tropfen, bestehend aus Aq. dest., 0,75 proz., 2 proz. oder 10 proz. Kochsalzlösung auftreten. War hierdurch erwiesen, dafs die Kugelbildung gänzlich unabhängig ist von den Bakterien, so zeigte sich andrerseits, dafs sie aufs innigste zusammenhängt mit der Beschaffenheit des Deckglases. Benutzte ich nämlich Deckgläser, welche durch Kochen mit Kaliumbichromat-Schwefelsäurelösung, Waschen mit Wasser, Alkohol und Äther gründlich gereinigt und bis zum Gebrauch vor der Berührung mit verunreinigenden Gegenständen ängstlich behütet worden waren, so traten die Kugeln nicht auf. Diese Tatsache konstatierte ich an etwa 70 hängenden Tropfen. Die Plasmoptysekugeln haben sonach ihre Entstehung zweifelsohne ungenügend gereinigten Deckgläsern zu verdanken.

Welcher Art die Stoffe sind, aus welchen sich die Kugeln bilden, darüber haben weitere Versuche kein sicheres Resultat ergeben. Die Färbung mit Osmiumsäure oder Sudan III gelang nicht in dem Grade, dafs man die Kugeln als Fett hätte bezeichnen können. Sicher ist, dafs das Vaselin oder das flüssige Paraffin, welches zum Abschlufs des Deckglases dient, keine Rolle spielt, denn die Resultate blieben die gleichen, wenn ich das Deckglas mit Siegellack oder Paraffin von hohem Schmelzpunkt (40°) abschlofs. Wahrscheinlich handelt es sich um Kohlenwasserstoffe, welche sich bei der Fabrikation der Deckgläser auf diesen aus der rauchenden Flamme kondensieren.

Erst einige Zeit nachdem ich diese Untersuchungen abgeschlossen und in der Gesellschaft für Morphologie und Physiologie in München darüber berichtet hatte, wurde ich darauf aufmerksam gemacht, dafs Fischer in der zweiten Auflage seines Lehrbuches »Vorlesungen über Bakterien« (erschienen 1903) seine Ansichten über die Plasmoptyse modifiziert habe. In der Tat findet sich in diesem Buche eine Anmerkung folgenden Inhalts: ». . . . Besonders wird man eine Beschreibung der Plasmoptyse an dieser Stelle vermissen. Ich benutze gerne die Gelegenheit, bereits hier, auf eine später zu veröffentlichende Arbeit verweisend, hervorzuheben, dafs einige Irrtümer in meiner

früheren Arbeit sich eingeschlichen haben, die zum Teil auf einem ungeahnten Einflufs der Deckgläser beruhen. . . . .«

Fischer hat sich also ohne Zweifel schon selbst davon überzeugt, dafs er durch die Unreinheit seiner Deckgläser getäuscht worden ist. Da er es aber, soviel mir bekannt ist, bisher unterlassen hat, den Sachverhalt genauer darzulegen, hielt ich mich für berechtigt, im vorstehenden über das Ergebnis meiner Untersuchungen zu berichten, auch nachdem mir der Widerruf Fischers bekannt geworden war.

Für Choleravibrionen will Fischer, wie aus der Darstellung auf S. 48 seines Lehrbuches hervorgeht, die Plasmoptyse auch jetzt noch retten, wenn er sie auch nicht mehr als osmotische Erscheinung, sondern nur als Degenerationserscheinung aufgefafst wissen will. Er schreibt: »Zwischen den schlanken Vibrionen finden sich zahlreiche, genau kugelige Gebilde mit mattem Inhalt, in dem oft ein glänzendes Körperchen schärfer hervortritt. Diese Plasmoptysekugeln sind in 1—2 Tage alten Kulturen zum Teil noch gut beweglich und tragen eine Geifsel, wie der Choleravibrio. Wie die noch schlank gebliebenen Vibrionen sind auch die Kugeln plasmolysierbar, sie haben eine besondere Zellwand und protoplasmatischen Inhalt.« Diese Gebilde, welche Fischer, wieder im Irrtum, jetzt für identisch erklärt mit den Pfeifferschen Kügelchen, sind natürlich scharf verschieden von den oben charakterisierten »Plasmoptysekugeln.« Es ist wohl kein Zweifel, dafs diese Kugeln dasselbe sind wie die Ferranschen Körperchen, welche auch Firtsch in dem Laboratorium von Prof Gruber in Graz bei Vibrio Proteus gefunden und beschrieben hat. Ob nun diese Kugeln durch Aufquellung oder Aufblähung des Bakterienleibes entstehen, oder ob sie, wie Fischer meint, ausgestofsenes Protoplasma darstellen, welches alsbald eine neue Zellmembran ausscheidet, möge dahingestellt bleiben.